



Maria Leonor Duarte Caldeira

Licenciada em Bioquímica

**Produção de SCO (*Single Cell Oil*) para biodiesel a partir da
microalga *Chlorella protothecoides* em diversos
bioreactores com troca simbiótica de correntes gasosas.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Prof. Doutor Alberto Reis, Investigador, LNEG

Júri:

Presidente: Prof^a. Doutora Ana Cecília Afonso Roque

Arguente: Prof^a. Doutora Ana Teresa Fialho Caeiro
Caldeira Rodrigues Palma



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro 2011

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“Tentem deixar este mundo um pouco
melhor do que o encontraram...”

Baden - Powel

Agradecimentos

Após a conclusão desta dissertação não posso deixar de agradecer a todos aqueles que me incentivaram e apoiaram ao longo deste trabalho.

Primeiro queria agradecer aos meus pais e à minha irmã que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e estão sempre presentes.

Ao meu orientador Doutor Alberto Reis pela disponibilidade com que me acolheu no LNEG, pela paciência e confiança que sempre teve para comigo, mostrando sempre uma sabedoria infindável que contagiava o gosto pela ciência.

Um especial obrigado à Carla Santos, que sempre foi uma amiga incansável, à Doutora Teresa pela disponibilidade de ajuda sempre que necessário, e a todos os estagiários e bolsiros da Unidade de Bioenergia do LNEG, pela convivência e momentos de alegria.

Por fim, não esquecer todos os meus amigos que directa ou indirectamente me apoiaram em todas as situações e que permitiram a conclusão deste trabalho.

Resumo

A associação de dois bioreactores, um fotoautotrófico e um heterotrófico, ligados entre si através das suas correntes gasosas de entrada e saída com troca de gases, nomeadamente CO₂ e O₂, pode gerar um benefício em ambas as culturas.

A corrente gasosa de saída do fotobioreactor, rica em O₂, é usada como corrente de entrada no bioreactor heterotrófico, fermentador, e em paralelo, a corrente de saída do fermentador, rica em CO₂ é usada como corrente de entrada no fotobioreactor, proporcionando um melhor crescimento de biomassa e uma melhor produtividade em biomassa e lípidos para posterior transformação em biodiesel.

A microalga *Chlorella protothecoides* e a levedura *Rhodotorula glutinis* foram escolhidas como microrganismos modelo uma vez que, aliadas à sua robustez, apresentam elevadas produtividades de biomassa e lípidos em regime autotrófico (microalga) e heterotrófico (microalga e levedura). Neste trabalho foram realizados estudos de optimização sobre o crescimento heterotrófico da microalga em meio simples com diferentes fontes de carbono, no qual a glucose apresentou a mais elevada taxa de crescimento (μ), 0,037 h⁻¹, e a melhor produtividade em biomassa ($P_{x_{max}}$), 1,55 g/l.d.

A simbiose entre *Chlorella protothecoides* autotrófica e a levedura heterotrófica *Rhodotorula glutinis*, revelaram resultados bastante promissores no sentido de fornecimento de ar rico em CO₂ ao fotobioreactor, proveniente da fermentação da levedura, aumentando a taxa de crescimento da alga autotrófica 30%, o que leva a um aumento da produtividade em biomassa em 100%, e consequentemente a um aumento na produtividade em lípidos. Este resultado é de interesse biotecnológico e passível de levar a futuros estudos de ampliação de escala com possibilidade de diminuição dos custos de produção de biomassa e seus produtos sem a necessidade de investimentos adicionais.

Palavras-chave: *Chlorella protothecoides*, biodiesel, simbiose, fermentação, fotobioreactores (FBR), Citómetria de fluxo

Abstract

The combination of two bioreactors, one photoautotrophic and one heterotrophic, interconnected through their inlet and outlet gas streams, exchanging CO₂ and O₂, can be of mutual benefit in terms of either biomass or lipid productivities towards biodiesel.

The rich-O₂ exiting gas stream from the photobioreactor, is used as an entering stream for the heterotrophic bioreactor (fermentor), and, at the same time, the fermentor exit gas stream, rich in CO₂, it is used as an inlet gas stream for the photobioreactor, enhancing biomass growth and productivities.

The microalgae *Chlorella protothecoides* and the yeast *Rhodotorula glutinis* were chosen as model microorganisms, as they are robust and undergo fast growth together with high lipid content in autotrophic regime (microalgae) and heterotrophic (microalgae and yeast). In this thesis several optimization studies have been made about the heterotrophic growth of the microalgae in simple environment with some carbon sources, in which the glucose shows the most high growth rate (μ), 0,037 h⁻¹ and the best biomass productivity ($P_{x_{max}}$), 1,55 g/l.d.

The symbiosis between the autotrophic *Chlorella protothecoides* and the heterotrophic yeast *Rhodotorula glutinis*, showed really promising results when the outlet gas from the fermentor was connected to the photobioreactor, providing a 30% increase on the microalgae growth rate compared to the control, leading to an increase on lipid productivity. This result is of biotechnological relevance and can be scale-up, giving the possibility of trimming biomass production costs and its products without having to do additional investments.

Key words: *Chlorella protothecoides*, biodiesel, symbiosis, fermentation, photobioreactors (PBR), Flow citometry

Índice de matérias

Agradecimentos	VII
Resumo.....	IX
Abstract	XI
Índice de matérias	XIII
Índice de figuras	XV
Índice de tabelas	XIX
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	XXI
1. Introdução	1
1.1. Biodiesel	2
1.2. Microalgas	3
1.2.1. Cultivo de microalgas	5
1.2.2. Sistemas de Culturas	7
1.2.2.1. Sistemas fechados versus abertos	7
1.2.2.2. Operação descontínua versus Operação contínua	7
1.2.2.3. Simbiose de gases entre culturas autotróficas e heterotróficas.....	8
1.2.3. <i>Chlorella protothecoides</i>	9
1.3. A levedura <i>Rhodotorula glutinis</i>	10
1.4. Citometria de fluxo.....	11
2. Materiais e Métodos	15
2.1. Microrganismos.....	15
2.2. Composição dos meios.....	15
2.3. Estudo do crescimento de <i>Chlorella protothecoides</i> heterotrófica em diversas fontes de carbono	16
2.4. Cultivo de <i>Chlorella protothecoides</i>	17
2.4.1. Autotrófico	17
2.4.2. Heterotrófico.....	18
2.5. Cultivo de <i>Rhodotorula glutinis</i>	20
2.6. Simbiose	21
2.7. Métodos Analíticos.....	22
2.7.1. Análise do crescimento	22
2.7.2. Determinação da glucose.....	22
2.7.3. Determinação de nitratos	22
2.7.4. Determinação da amónia.....	23

2.7.5. Citometria de fluxo.....	Erro! Marcador não definido.
3. Resultados e Discussão	25
3.1. Estudo de <i>Chlorella protothecoides</i> heterotrófica em meio com diferentes fontes de carbono orgânico	25
3.2. Estudo da simbiose por troca gasosa entre <i>Chlorella protothecoides</i> autotrófica e heterotrófica	29
3.2.1. FBR -> Fermentador	29
3.2.2. Fermentador -> FBR	34
3.3. Estudo da simbiose por troca gasosa entre <i>Chlorella protothecoides</i> autotrófica e <i>Rhodotorula glutinis</i> heterotrófica.....	41
3.3.1. FBR -> Fermentador	41
3.3.2. Fermentador -> FBR	46
4. Conclusão	51
Bibliografia	53
ANEXOS	57
Anexo 1: Cálculo das taxas de crescimento	59
Anexo 2: Cálculo da Produtividade volumétrica em Biomassa.....	60
Anexo 3: Cálculo do Rendimento em relação à fonte de carbono	61
Anexo 4: Cálculo da taxa volumétrica de consumo de Glucose	62
Anexo 5: Correlação entre a fluorescência e o teor em lípidos totais, para <i>Chlorella protothecoides</i>	63
Anexo 6: Cálculo da Produtividade volumétrica em lípidos totais	64
Anexo 7: Cálculo da taxa volumétrica de consumo de Nitrato.....	65
Anexo 8: Cálculo do Rendimento em relação à fonte de azoto.....	66
Anexo 9: Cálculo da taxa volumétrica de consumo de amónia	67

Índice de figuras

Figura 1.1.: Várias vias metabólicas possíveis para a nutrição de microalgas, onde o crescimento autotrófico e heterotrófico são os mais importantes [8].....	6
Figura 1.2.: Suspensão celular de <i>Chlorella protothecoides</i> cultivada autotroficamente, ampliação 40x10, LNEG 2010.....	8
Figura 1.3.: Colónias de <i>Rhodotorula glutinis</i> , crescidas em placa de agar.....	9
Figura 1.4.: Exemplo de uma configuração de um citómetro de fluxo [Adaptado de 13].....	10
Figura 2.1.: Esquema de um fotobioreactor (FBR) vertical alveolar para o cultivo autotrófico de microalgas. (1) Suspensão celular; (2) Rotâmetro; (3) Entrada de ar comprimido ; (4) Saída de ar; (5) Saída da amostra para análise.....	17
Figura 2.2.: Esquema de um fermentador para cultivo heterotrófico de microalgas. (1) Suspensão celular;(2) Agitador; (3) Fonte de alimentação; (4) Rotâmetro para a entrada de ar comprimido; (5) Medidor de pH; (6) Medidor de Oxigénio dissolvido; (7) Controlador; (8) Ácido; (9) Base; (10) Saída de ar.	18
Figura 3.1.: Gráfico esquemático do crescimento de <i>Chlorella protothecoides</i> em <i>erlenmeyers</i> agitados, em 5 fontes de carbono diferentes, glucose, lactose, glicerol, acetato e xilose.....	25
Figura 3.2.: Gráfico esquemático da variação do pH ao longo do tempo, nos meios com diferentes fontes de carbono.....	25
Figura 3.3.: Gráfico esquemático da variação da concentração de glucose no meio MCS e meio <i>Standard</i> ao longo do tempo, no ensaio das fontes de carbono.....	26
Figura 3.4.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de <i>Chlorella protothecoides</i> em condições autotróficas. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação da percentagem de oxigénio dissolvido no meio; (C) Variação da percentagem de O ₂ ; (D) Variação da percentagem de CO ₂	28
Figura 3.5.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de <i>Chlorella protothecoides</i> em condições heterotróficas. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação da percentagem de oxigénio dissolvido no meio (linha azul), e variação das rotações, rpm, (linha vermelha); (C) Variação da percentagem de O ₂ ; (D) Variação da percentagem de CO ₂	30

Figura 3.6.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições heterotróficas. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação da percentagem de oxigénio dissolvido no meio; (C) Concentração de glucose, g/l; (D) Percentagem de células mortas; (E) Concentração de lípidos, g/l; (F) Variação da percentagem de CO₂; (G) Variação da percentagem de O₂.....33

Figura 3.7.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições heterotróficas, em operação descontínua em erlenmayer. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação do pH; (C) Percentagem de células mortas; (D) Concentração de lípidos, g/l.....33

Figura 3.8.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições autotróficas, em operação descontínua seguida de semi-contínua, a receber ar rico em CO₂ proveniente da fermentação de *Chlorella protothecoides* heterotrófica. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação da percentagem de O₂; (C) Variação da percentagem de CO₂.....36

Figura 3.9.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições autotróficas, em operação descontínua seguida de semi-contínua, sendo o controlo do FBR em simbiose anterior. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação de percentagem de O₂; (C) Variação da percentagem de CO₂.....37

Figura 3.10.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições autotróficas. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Concentração de Nitrato N-NO₃⁻, g/l; (C) Percentagem de células mortas; (D) Concentração de lípidos, g/l.....40

Figura 3.11.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Rhodotorula glutinis* em condições heterotróficas, a receber ar rico em O₂ proveniente do FBR. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação da percentagem de oxigénio dissolvido no meio; (C) Concentração de glucose, g/l; (D) Concentração de amónia, mg/l; (E) Variação da percentagem de O₂; (F) Variação da percentagem de CO₂; (G) Percentagem de células mortas; (H) Concentração de lípidos, g/l.....42

Figura 3.12.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Rhodotorula glutinis* em condições heterotróficas. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação da percentagem de oxigénio dissolvido no meio; (C) Concentração de glucose, g/l; (D) Concentração de amónia, mg/); (E) Percentagem de células mortas; (F) Concentração de lípidos, g/l.....44

Figura 3.13.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições autotróficas, a receber ar rico do fermentador com *Rhodotorula glutinis*. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Concentração de Nitrato N-NO_3^- , g/l; (C) Variação da percentagem de oxigénio dissolvido no meio; (D) Variação da percentagem de CO_2 ; (E) Variação da percentagem de O_246

Figura 3.14.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições autotróficas, como controlo do FBR anterior. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Concentração de Nitrato N-NO_3^- , g/l; (C) Variação da percentagem de CO_2 ; (D) Variação da percentagem de O_247

Índice de tabelas

Tabela 1.1.: Comparação de produtividade de óleo por área de terreno ocupado para espécies oleaginosas potenciais fontes de biodiesel [4].	3
Tabela 1.2.: Conteúdo em lípidos de algumas microalgas [4].....	4
Tabela 1.3.: Conteúdo e produtividades em lípidos de algumas espécies de microalga do Género <i>Chlorella</i> [Adapatado de 1].....	5
Tabela 3.1.: Parâmetros de crescimento no ensaio das diferentes fontes de carbono testadas.	26
Tabela 3.2.: Parâmetros de crescimento de <i>Chlorella protothecoides</i> , em meio orgânico, em dois tipos de reactor, fermentador e erlenmayer.	36
Tabela 3.3.: Parâmetros de crescimento de <i>Chlorella protothecoides</i> , em meio inorgânico, em dois FBR, um FBR simbiótico e um controlo.....	38
Tabela 3.4.: Parâmetros de crescimento de <i>Chlorella protothecoides</i> , em meio inorganico, em dois FBR, um FBR simbiótico e um controlo	49

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

CO₂	Dióxido de Carbono
O₂	Oxigénio
KOH	Hidróxido de Potássio
NaOH	Hidróxido de Sódio
HCl	Ácido Clorídrico
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Solução salina de fosfato)
NH₄⁺	Amónia
NO₃⁻	Nitrato
SO₂	Dióxido de Enxofre
NO_x	Termo genérico para Óxidos de mono-azoto
VOCs	<i>Volatile Organic Compounds</i> (Compostos orgânicos voláteis)
pH	Símbolo indicador da acidez, neutralidade e alcalinidade de uma solução aquosa
FBR	Fotobioreactor
FS	<i>Foward scatter</i> (Dispersão a 0°)
SS	<i>Side scatter</i> (Dispersão lateral, 90°)
FL	<i>Fluorescence detector</i> (Detector de fluorescência)
°	Graus
°C	Graus Célsios
PI	<i>Potassium Iodide</i> (Iodeto de Potássio)
NR	<i>Nile Red</i> (Vermelho do Nilo)
MCV	Meio Inorgânico Completo para <i>Chlorella protothecoides</i>
MCS	Meio de <i>Chlorella</i> Simples
MYR	Meio Yoon e Rhee para limitação de carbono de <i>Rhodotorula glutinis</i>
PPG	Propilenoglicol
YMAgar	<i>Yeast Medium Agar</i> (Meio de Agar para Levedura)
Kg	Quilograma
g	Gramma
mg	Miligrama
l	Litro
ml	Mililitro
µl	Microlitro

cm	Cêntimetro
µm	Micrometro
nm	Nanometro
h	Hora
rpm	Rotações por minuto
atm	Atmosfera
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
M	Molar (mol/l)
QS	Quatzo-Silica
NCYC	<i>National Collection of Yeast Culture</i> (Colecção Nacional de Cultura de Leveduras)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ln	Logaritmo base e
C	Carbono
N	Azoto
S	Substrato
Abs	Absorvância
µ	Taxa de crescimento de biomassa (h^{-1})
X_{max}	Concentração máxima de biomassa (g/l)
P_{Xmax}	Produtividade máxima em biomassa ($g.l^{-1}.d^{-1}$)
Lip_{max}	Concentração máxima de Lípidos (g/l)
P_{Lip max}	Produtividade máxima em Lípidos ($g.l^{-1}.d^{-1}$)
r_{Glu}	Taxa volumétrica de consumo de Glucose ($g.l^{-1}.d^{-1}$)
r_{NH4+}	Taxa volumétrica de consumo de Amónia amoniacal ($g.l^{-1}.d^{-1}$)
r_{NO3-}	Taxa volumétrica de consumo de Nitrato ($g.l^{-1}.d^{-1}$)
Y_{x/c}	Rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono (g/g)
Y_{x/N}	Rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto (g/g)
X	Biomassa
t	Tempo
d	dia

1. Introdução

A energia desempenha um papel fundamental em todas as actividades, tendo o desenvolvimento sócio-económico, das últimas décadas, sido relacionado por um forte crescimento do consumo energético, proveniente, essencialmente, de combustíveis fósseis.

O sector de transportes e energia são as principais fontes responsáveis, na União Europeia, por mais de 20% e 60% da emissão dos gases de efeito de estufa, respectivamente, sendo a agricultura a terceira maior fonte responsável, representando cerca de 9% das emissões [1].

Este consumo global de energia que é observado, tem a tendência de aumentar nos próximos anos com o desenvolvimento de novas economias em crescimento, como é o caso da Índia e da China, o que pode levar a danos ambientais devastadores.

Os gases de efeito de estufa contribuem não só para o aquecimento global, mas também para outros impactos no meio ambiente e na vida humana. A nível ambiental, um grande impacto é o facto de os oceanos absorverem cerca de 1/3 do CO₂ emitido anualmente, o que levará a uma diminuição do pH das águas. Esta acidez nas águas dos oceanos causará danos irreversíveis a nível dos recifes de coral e de toda a biodiversidade do ecossistema marinho, o que posteriormente levará a um impacto negativo na vida terrestre também.

Como o aquecimento global é um problema que afecta tantos aspectos diferentes da vida humana e do ambiente, em geral, são necessárias um conjunto de soluções para o poder enfrentar.

Para encontrar fontes energéticas limpas e renováveis, actualmente estão a ser estudadas e implementadas várias opções alternativas, com diferentes graus de sucesso e em diferentes fases de estudo. Vários exemplos incluem energia solar, térmica ou fotovoltaica, geotermal, hidroeléctricas, eólica, biocombustíveis, entre outros, tendo cada um deles as suas próprias vantagens e desvantagens dependendo da área de aplicação [1].

Na área dos biocombustíveis, os mais comuns são o biodiesel e o bioetanol que substituem, em parte o gasóleo e a gasolina, respectivamente, nos veículos, sendo que estes não precisam de nenhuma ou muito pouca modificação dos motores. Estes biocombustíveis são produzidos principalmente a partir de biomassa o que contribui bastante para a atenuação das emissões de gases de efeito de estufa.

1.1. Biodiesel

Embora os biocombustíveis ainda sejam mais caros que os combustíveis fósseis, a sua produção está a aumentar em vários países de todo o mundo.

A principal alternativa ao gasóleo é o biodiesel, o que representa cerca de 82% da produção total de biocombustíveis, que tende a crescer nos próximos tempos na Europa, Brasil e Estados Unidos.

O biodiesel de primeira geração tem vindo a ser produzido a partir de óleos vegetais, também usados para consumo humano, o que tem levado a um aumento da sua procura e por consequência do preço dos óleos alimentares, fazendo com que o custo do biodiesel aumente, dificultando a sua utilização, mesmo apresentando vantagens em relação ao gasóleo. Além disso, o biodiesel de primeira geração apresenta ainda a desvantagem de exigir uma plantação excessiva e pressão crescente para a mudança no uso de terra e aumento de campos de cultivo, o que pode levar à competição de terras e perda de biodiversidade, devido ao corte de florestas existentes e utilização de áreas de importância ecológica, e ainda a substituição de culturas utilizadas para consumo humano, o que gerou um conflito mundial em relação à fome.

A fim de não competir com os óleos vegetais comestíveis, nasce então a segunda geração de biodiesel, que pode ser produzido a partir de subprodutos e desperdícios biológicos de baixo custo e renováveis tais como os óleos não-comestíveis, óleos de fritura usados, gorduras animais e até sabão [2]. No entanto as quantidades disponíveis destes óleos usados e destas matérias-primas de baixo custo, não são suficientes face às exigências de hoje em dia para o biodiesel.

É então que surge, assim, a chamada terceira geração de biodiesel, produzido a partir de microalgas [3], que apresentam a vantagem de não competir com a alimentação humana ou animal à escala mundial, uma vez que não requerem terrenos agrícolas, bem como a redução das necessidades de terra (áreas), devido ao seu maior rendimento energético por hectare, Tabela 1.

Tabela 1.1.: Comparação de produtividade de óleo por área de terreno ocupado para espécies oleaginosas potenciais fontes de biodiesel [4].

Potenciais espécies oleaginosas	Rendimento óleo (L/ha)	Área de terra necessária (M. ha)
Milho	172	1540
Soja	446	594
Canola	1190	223
Côco	2689	99
Óleo de Palma	5950	45
Microalgas (70%(p/p) óleo em biomassa)	136900	2
Microalgas (30%(p/p) óleo em biomassa)	58700	4,5

1.2. Microalgas

As microalgas são organismos fotossintéticos procarióticos ou eucarióticos com estrutura simples unicelular ou multicelular que podem crescer rapidamente e conseguem viver em condições adversas. Um exemplo de microalgas procarióticas são as cianobactérias (*Cyanophyceae*) e microalgas eucarióticas são as algas verdes (*Chlorophyta*) e as diatomáceas (*Bacillariophyta*). As microalgas estão presentes em todos os ecossistemas da Terra, não só aquáticos mas também terrestres, e representam uma grande variedade de espécies que vivem em diversas condições ambientais. Esta grande variedade de diferentes espécies de microalgas faz também com que haja uma grande diversidade de aplicações onde estes microrganismos se inserem, tais como captação de CO₂ para a sua alimentação, biorremediação de águas residuais, produção de compostos bioactivos e produtos de química fina para cosmética, aplicações na saúde humana, alimentação em instalações de aquacultura e ainda como fonte de energia [1].

Dentro da aplicação energética, as microalgas podem ser usadas para gerar energia através de diversos métodos, como a produção de metano por digestão anaeróbia de biomassa microalgal, produção fotobiológica de biohidrogénio, entre outras, sendo que o processo mais utilizado e estudado é através da utilização do óleo microalgal para produção de biodiesel [2,4].

As microalgas são assim a matéria-prima alternativa da nova geração de produção de biodiesel, como já foi referido anteriormente.

Devido ao elevado conteúdo em óleos que certas espécies de microalgas apresentam, e à facilidade com que este pode ser extraído, usando a tecnologia actualmente disponível, estes microrganismos tornam-se bastante promissores nesta área dos biocombustíveis,

apresentando inúmeras vantagens em relação a outras matérias-primas disponíveis para produção de biodiesel. Além de apresentarem taxas de crescimento muito mais elevadas que as plantas, são práticas de cultivar, podem crescer com pouca ou nenhuma monitorização, não precisam de terra arável ou de água potável e a sua produção não é sazonal ao poderem ser colhidas diariamente [5].

Para o trabalho em questão, vamos ter em conta a grande vantagem de produção de lípidos que as microalgas apresentam. Em média o teor de lípidos varia entre 25 e 30% do peso seco mas sob certas condições específicas algumas espécies podem mesmo chegar a atingir perto dos 80%, Tabela 1.2. [1,4].

Tabela 1.2.: Conteúdo em lípidos de algumas microalgas [4].

Microalga	Conteúdo em óleo (% p/p)
<i>Botryococcus braunii</i>	25 – 75
<i>Chlorell</i> sp	28 – 32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp	16 – 37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp	25 – 33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp	20 – 35
<i>Nannochloropsis</i> sp	31 – 68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35 – 54
<i>Nitzschia</i> sp	45 – 47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20 – 30
<i>Schizochytrium</i> sp	50 – 77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15 - 23

A selecção da espécie mais adequada não deve ter em conta unicamente a quantidade de lípidos, mas também a produtividade de biomassa e a capacidade de se desenvolver usando nutrientes disponíveis ou condições ambientais específicas. Todos estes parâmetros devem ser considerados em simultâneo na selecção da espécie mais adequada à produção de biodiesel.

Além disto, também é importante considerar a composição dos ácidos gordos das diferentes espécies, porque vai influenciar as características do biodiesel produzido.

Uma boa opção de selecção para a produção de biodiesel é qualquer espécie de microalga do Género *Chlorella* dada as suas características promissoras apresentadas na Tabela 1.3. Todas as espécies de *Chlorella* aqui apresentadas têm, além de uma percentagem de lípidos bastante favorável, uma produtividade diária bastante promissora.

Tabela 1.3.: Conteúdo e produtividades em lípidos de algumas espécies de microalga do Género *Chlorella*
[Adaptado de 1].

Espécies de Microalgas Marinhas e de Água doce	Conteúdo em lípidos (% peso seco biomassa)	Produtividade em lípidos (mg/l/dia)	Produtividade volumétrica de biomassa (g/l/dia)	Produtividade por área de biomassa (g/m ² /dia)
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0 – 63,0	10,3 – 50,0	0,036 – 0,041	0,91 – 0,97
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6 – 57,8	1214	2,00 – 7,70	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0 – 22,0	44,7	0,23 – 1,47	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0 – 58,0	11,2 – 40,0	0,02 – 0,20	0,57 – 0,95
<i>Chlorella</i> sp	10,0 – 48,0	42,1	0,02 – 2,5	1,61 – 16,47
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2,0	-	2,90 – 3,64	72,5 / 130
<i>Chlorella</i>	18,0 – 57,0	18,7	-	3,5 – 13,90

1.2.1. Cultivo de microalgas

No geral, para o crescimento autotrófico de biomassa microalgal (que consiste em cerca de 40 a 50% de carbono), as microalgas dependem de um fornecimento suficiente de uma fonte de carbono e luz para poderem realizar a fotossíntese.

As microalgas podem assumir vários tipos de metabolismo, centrado em duas formas principais de nutrição, ou seja o autotrofismo e o heterotrofismo, dos quais o autotrofismo é o mais importante [6].

O autotrofismo, também chamado de fotoautotrofismo, utiliza a luz como fonte de energia única, para redução de CO₂ pela oxidação de substratos, que é convertida em energia química por meio de reacções fotossintéticas, com a libertação de O₂. Os organismos autotróficos requerem apenas iões minerais inorgânicos na composição do seu meio de cultura. [1,6]

O heterotrofismo utiliza compostos orgânicos como fonte de energia e carbono, isto é, o meio de cultura heterotrófico é bastante similar ao meio de cultura autotrófico com a excepção de que é adicionado um composto de carbono orgânico, normalmente glucose, acetato ou glicerol e crescem na ausência de luz. Por norma estas culturas heterotróficas apresentam algumas desvantagens, nomeadamente na limitação de espécies de microalgas que conseguem crescer desta forma; no aumento dos custos devido à adição de mais um composto no meio, o carbono orgânico; na contaminação e competição por outros microrganismos; inibição por excesso de substrato orgânico; e ainda de produzir metabolitos que só são induzidos pela presença de luz. [7,8]

Além destas vias principais de nutrição existem ainda outros metabolismos, não menos importantes, que são um misto dos dois trofismos anteriores, são eles o mixotrofismo e o fotoheterotrofismo, Figura 1.1..

O mixotrofismo, consiste na realização da fotossíntese como principal fonte de energia, apesar dos compostos orgânicos e do CO₂ serem essenciais para o crescimento celular. Dentro deste tipo de trofismo existe ainda o anfítrofismo que significa que os microrganismos conseguem viver auto e heterotroficamente, dependendo da concentração de compostos orgânicos e intensidade luminosa disponível.

O fotoheterotrofismo, também conhecido como foto-organotrofismo, descreve um metabolismo em que a luz é necessária para que os compostos orgânicos sejam consumidos como fonte de carbono.

Existe ainda o modo nutricional auxotrófico que consiste na necessidade de apenas pequenas quantidades de compostos orgânicos essenciais, como vitaminas e aminoácidos.

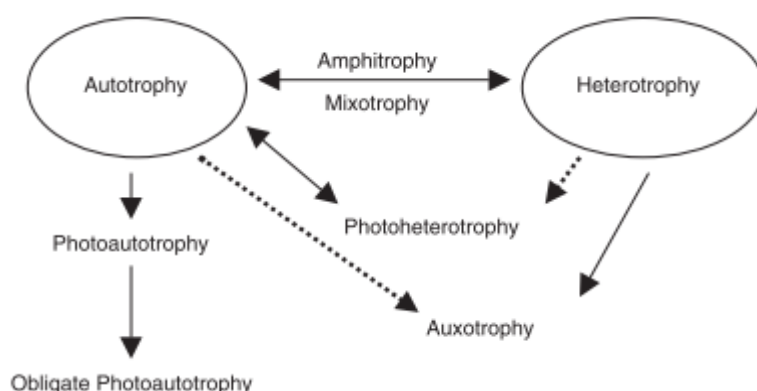


Figura 1.1.: Várias vias metabólicas possíveis para a nutrição de microalgas, onde o crescimento autotrófico e heterotrófico são os mais importantes [8].

Mas, não só o carbono orgânico ou substrato (fonte de carbono), vitaminas, sais e outros nutrientes (como o azoto e fósforo) são necessários para o crescimento de microalgas, também é necessário que se mantenha um equilíbrio entre outros parâmetros operacionais, como o pH, temperatura, intensidade luminosa, entre outros.

Sob todas as condições favoráveis e nutrientes suficientes, as microalgas podem apresentar elevadas velocidades de crescimento. Em geral, a maioria das microalgas tem um tempo de duplicação de biomassa de cerca de 24 horas, mas em casos muito favoráveis poderá atingir 3,5 horas durante a fase exponencial de crescimento. [4]

1.2.2. Sistemas de Culturas

1.2.2.1. *Sistemas fechados versus abertos*

O cultivo de microalgas pode ser feito em sistemas abertos de cultura como lagoas ou reactores *raceway* e sistemas de cultura fechados altamente controlados chamados fotobioreactores (FBR), caso seja uma cultura autotrófica, e fermentadores, caso se trate de uma cultura heterotrófica.

Os sistemas de cultura abertos normalmente são menos dispendiosos tanto de construir como depois de operar, são mais duradouros mas têm uma produtividade relativamente baixa [1]. Apresentam as seguintes desvantagens: têm uma razão área/volume pequena; é difícil manter um mono-cultivo de microalgas devido às contaminações provenientes do ar atmosférico, excepto se se tratar de uma espécie extremófila; os parâmetros ambientais de crescimento do cultivo dependem principalmente das condições meteorológicas locais e raramente podem ser controladas; e ainda a colheita é trabalhosa e cara devido à baixa densidade celular [4,9].

Os sistemas de cultura fechados, como os FBR, são sistemas flexíveis e podem ser optimizados de acordo com as características biológicas e fisiológicas das espécies de microalgas a cultivar, permitindo o crescimento de espécies que não conseguem crescer em lagoas abertas. Num FBR as trocas directas de gases e contaminantes entre as células cultivadas e o meio exterior são limitadas ou até mesmo não permitidas pelas paredes do reactor. Dependendo da sua forma, os reactores fechados são considerados como tendo várias vantagens sobre os sistemas abertos, como o facto de oferecerem um melhor controlo das condições de cultura e parâmetros de crescimento (pH, temperatura, O₂ ou CO₂ dissolvidos, mistura) levando assim a uma consequente maior produtividade volumétrica [1,4].

1.2.2.2. *Operação descontínua versus Operação contínua*

Os reactores biológicos podem trabalhar em descontínuo, em semi-contínuo ou em contínuo, sendo que as operações em contínuo oferecem mais vantagens em relação às operações em descontínuo, como o facto de proporcionarem um maior grau de controlo; as taxas de crescimento podem ser reguladas e mantidas por longos períodos de tempo; a taxa de crescimento pode ser controlada pela taxa de diluição; e ainda a obtenção de resultados mais fiáveis e de fácil reprodutibilidade. No entanto também têm desvantagens associadas como por exemplo o controlo da produção de produtos não associados ao crescimento. Por este motivo, o processo contínuo exige muitas vezes um cultivo semi-contínuo, isto é, um fornecimento contínuo ou pulsado de nutrientes.

1.2.2.3. Simbiose de gases entre culturas autotróficas e heterotróficas

O fornecimento de energia e fonte de carbono têm sido apontados entre as grandes causas das dificuldades no cultivo de microalgas.

No crescimento autotrófico, quanto ao fornecimento de luz como fonte de energia, sabe-se que elevadas intensidades luminosas combinadas com baixas concentrações de biomassa podem ser prejudiciais para as culturas devido à foto-inibição e foto-oxidação. No entanto, baixas intensidades luminosas e elevadas concentrações de biomassa aumentam o consumo endógeno de biomassa por respiração, porque nem todas as células conseguem captar luz. Ambas as situações induzem baixas produtividades.

O dióxido de carbono, fonte de carbono, pode ser fornecido através de ar comprimido, mas o problema está no conteúdo de CO_2 no ar, que é de apenas 0,04%, fazendo com que as culturas sejam limitadas em carbono. No entanto as microalgas precisam de uma quantidade superior de CO_2 , cerca de 2 a 5%, para conseguirem um crescimento óptimo, não limitado em carbono [5].

Para combater este problema, poderia ser usado gás de combustão como uma fonte de suplemento de CO_2 mais barato, mas o SO_2 , NO_x e VOCs contidos nestes gases podem causar inibição no crescimento das microalgas [10]

Sendo assim, o CO_2 extra necessário para o óptimo crescimento das microalgas autotróficas pode ser fornecido através da respiração de microrganismos heterotróficos. O uso de CO_2 vindo da respiração como fonte de carbono para produção de biomassa de microalgas autotrófico apresenta várias vantagens das quais o facto de ser uma fonte de carbono de baixo custo e livre de toxinas, serem as vantagens mais significativas. Além de que o oxigénio necessário para a respiração dos microrganismos heterotróficos pode também ser fornecido através da fotossíntese realizada pelas microalgas autotróficas. [5]

Assim a associação destes dois reactores, um autotrófico e outro heterotrófico, levaria a um suplemento duplo, podendo alcançar elevadas produtividades em ambos os reactores e diminuindo os custos de produção.

1.2.3. *Chlorella protothecoides*

Chlorella é um género de microalga verde, do Filo *Chlorophyta*, que é encontrada em todos os habitats aquáticos existentes. [9]

De forma esférica ou elipsoidal e cerca de 2-10 µm de diâmetro, Figura 1.2, a *Chlorella* é essencialmente conhecida pelo seu elevado conteúdo em carotenóides, como a luteína, e também o seu elevado conteúdo em lípidos.

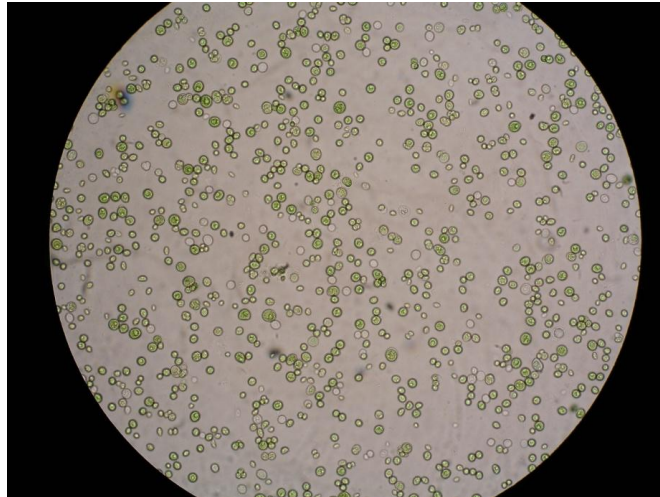


Figura 1.2.: Suspensão celular de *Chlorella protothecoides* cultivada autotroficamente, ampliação 40x10, LNEG 2010.

Tendo ciclos de vida relativamente simples, a sua taxa de crescimento normalmente é bastante elevada, chegando a duplicar entre 16 a 24 horas, mas tendo por norma como factor limitante a intensidade luminosa.

A sua reprodução, exclusivamente assexuada, segue essencialmente três etapas: crescimento, maturação e por fim divisão.

Na etapa de divisão, a célula mãe divide-se, produzindo 4 ou 8, e muito raramente 16, esporos, que são depois libertados pela ruptura ou dissolução das paredes da célula mãe.

Devido às suas propriedades únicas, quer em carotenóides ou em óleos, *Chlorella* tornou-se alvo de cultivo em todo o mundo, uma vez que pode oferecer bastantes benefícios em diversas áreas, como a área energética, farmacêutica, alimentar, entre muitas outras.

Outra característica desta espécie de microalga, é o facto de ser um microrganismo autotrófico facultativo, isto é, também cresce bem em meios heterotróficos e mixotróficos. Esta versatilidade de metabolismo que é oferecida por esta microalga leva a que seja um alvo de estudo uma vez que pode oferecer muitos mais benefícios ou até melhorar certas características que já lhe são atribuídas. [9]

1.3. A levedura *Rhodotorula glutinis*

A levedura *Rhodotorula glutinis* pertencente ao filo *Basidiomycota*, é uma levedura essencialmente pigmentada, Figura 1.3.,



Figura 1.3.: Colónias de *Rhodotorula glutinis*, crescidas em placa de agar.

Conhecida pelo seu elevado conteúdo em carotenóides, como o β -caroteno, o toruleno e o torularrudina, e também pelo seu elevado teor em lípidos, é também considerada uma “single cell oil”, despoletando bastante interesse em diversas áreas de estudo como na indústria farmacêutica, alimentar e na produção de óleo para biodiesel. [11]

Além disso, visto ser uma levedura heterotrófica, faz respiração, isto é, consome oxigénio libertando CO_2 , e uma vez que apresenta elevada taxa de crescimento, consequentemente apresenta também grande taxa de consumo de oxigénio originando posteriormente grande taxa de produção de CO_2 .

Estas elevadas taxas de produção de CO_2 são bastante importantes, uma vez que podem surgir como um fornecimento extra de CO_2 a culturas de microalgas autotróficas, quando a saída da corrente de ar de um fermentador de levedura é ligado à corrente de entrada de ar no fotobioreactor, mostrando assim uma simbiose positiva entre leveduras e microalgas.

1.4. Citometria de fluxo

Um citómetro de fluxo é um sistema constituído por 5 elementos: fonte de radiação (lâmpada de mercúrio ou laser), uma câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos para a selecção de um intervalo de comprimento de onda específico, fotomultiplicadores para a detecção sensível e processamento de sinal, e ainda uma unidade que processa os dados recolhidos, Figura 1.4. [12].

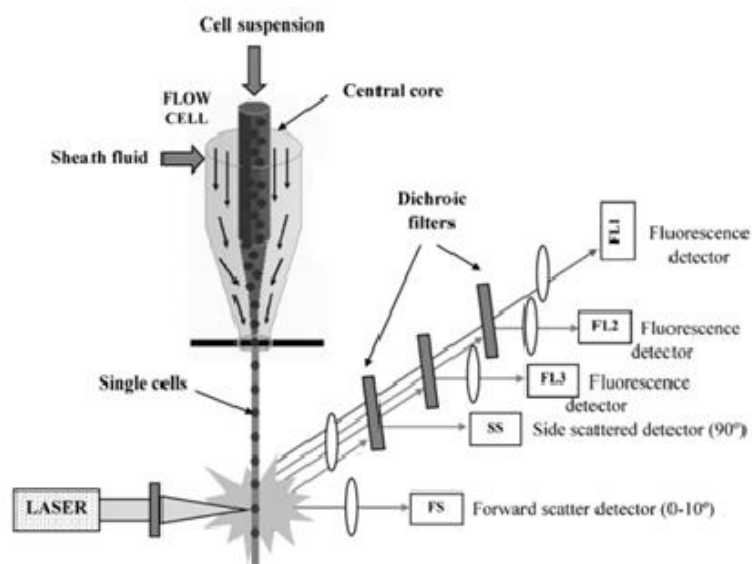


Figura 1.4.: Exemplo de uma configuração de um citómetro de fluxo [Adaptado de 13].

A suspensão celular a analisar é injectada, no seio de uma solução salina (*sheath fluid*), e atravessa a câmara onde se dá a passagem célula a célula através do feixe de radiação, perpendicular ao fluxo.

O feixe de radiação de excitação ao interceptar a célula na câmara, sofre dispersão que depois é convertida em sinais e reconhecida pelos sensores.

A radiação detectada pelo sensor *Forward scatter* (FS), que está colocado na direcção do feixe luminoso, dá-nos informação sobre o tamanho da célula, já a radiação detectada pelo sensor *Side scatter* (SS), que se encontra colocado a sensivelmente 90° da direcção do feixe luminoso, informa-nos sobre a complexidade no interior da célula. Os sensores FL1, FL2 e FL3, são detectores de fluorescência, que permitem encontrar compostos intracelulares com fluorescência intrínseca, como é o caso de clorofilas, NAD(P)H, e outras mais, ou então compostos que têm a propriedade de se ligarem a corantes fluorescentes, permitindo a diferenciação de subpopulações. Os citómetros mais sofisticados podem possuir até 16 detectores em simultâneo, o que permite analisar múltiplas possibilidades de características celulares. [12, 13]

Uma das grandes vantagens da citometria de fluxo, é conseguir diferenciar a viabilidade de uma célula individual através de um corante fluorescente, o iodeto de propídio (PI). Este corante consegue atravessar a membrana citoplasmática de células, em que a membrana já está despolarizada e aberta, isto é permeabilizada, ligando-se ao seu ADN, provocando assim a fluorescência. Deste modo conseguimos distinguir com facilidade as duas subpopulações de uma determinada população, uma vez que as células não viáveis, que estão coradas, vão emitir fluorescência de cor vermelha, enquanto as células viáveis não emitem qualquer fluorescência. Este método consegue oferecer uma grande precisão na percentagem de células viáveis e não viáveis, e é bastante importante e precioso no decorrer de experiências laboratoriais em que o conhecimento da viabilidade celular é crucial para o sucesso do ensaio. [12,13]

Outras das grandes vantagens, e bastante relevante para o trabalho em questão, diz respeito à capacidade de avaliar em tempo quase real o conteúdo em lípidos de uma célula, recorrendo também a um corante, de nome Vermelho do Nilo (Nile Red, NR). O NR é um composto lipofílico que se liga aos lípidos celulares emitindo fluorescência vermelha e amarela. A fluorescência vermelha é obtida da associação do NR aos lípidos polares, essencialmente presentes na membrana citoplasmática, ao mesmo tempo que a fluorescência amarela é proveniente da associação do NR aos lípidos neutros, essencialmente de reservas lipídicas intracelulares, por fim através de uma correlação linear entre o teor de lípidos e a fluorescência, consegue-se saber a quantidade de lípidos presentes nas células.

A grande vantagem de usar este método de citometria de fluxo, para determinação do conteúdo em lípidos, em relação aos métodos tradicionais já existentes, como a Cromatografia gasosa para ácidos gordos [13], o método Bligh and Dyer [14], ou a extracção de soxhlet [15], é que a citometria é um método bastante rápido e eficaz, que necessita de um pequeno volume de amostra, ao contrário dos outros métodos que são bastante morosos e recorrem ao uso de solventes orgânicos, além de que se consegue seguir a evolução dos lípidos intracelulares em tempo quase real, levando a uma optimização de todos os parâmetros essenciais para obter mais e melhores lipídios, que posteriormente pode vir a oferecer mais e melhor biodiesel. [13, 16, 17]

O objectivo deste trabalho, centra-se na simbiose de gases entre as culturas auto e heterotróficas, que têm o intuito de melhorar o crescimento dos microrganismos, oferecendo-lhe ar enriquecido no componente essencial para o seu crescimento.

A simbiose entre as culturas auto e heterotróficas de *Chlorella protothecoides*, e *Rhodotorula glutinis*, ocorrem no sentido de fornecimento de ar rico em CO₂ ao FBR, que contem microalga autotrófica, proveniente do fermentador, com alga heterotrófica ou a levedura, e no sentido inverso, isto é, no fornecimento de ar rico em O₂ ao fermentador, para alimentar as algas heterotróficas ou a levedura, provenientes da fotossíntese das algas autotróficas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Microrganismos

A microalga usada neste estudo foi a estirpe 25 de *Chlorella protothecoides*, da *UTEX Collection* (Texas University of Austin, USA). As culturas autotróficas são mantidas em meio líquido MCV (composição do meio descrito no subcapítulo seguinte) e repicadas cada 3 semanas, tal como as culturas heterotróficas que são mantidas em meio MCS (composição do meio descrito no subcapítulo seguinte).

A levedura *Rhodotorula glutinis* NCYC 1026 (Harrison 1927) foi adquirida na *National Collection of Yeast Culture*, e mantida em rampas de meio YMAgar incubada na estufa a 37°C, durante 3 dias e depois mantida no frio a 4°C.

2.2. Composição dos meios

O cultivo autotrófico de *Chlorella* foi feito em meio inorgânico completo (MCV) que continha por litro: 1,25g KNO₃; 1,25g KH₂PO₄; 1g MgSO₄.7H₂O; 0,11g CaCl₂.H₂O; 0,5g NaHCO₃; 0,1mg FeEDTA.3H₂O; e 10ml de uma Solução de Elementos Traço com a seguinte composição por litro: 222mg ZnSO₄.7H₂O; 79mg CuSO₄.5H₂O; 15mg MoO₃; 2,86g H₃BO₃; e MnCl₂.4H₂O. Os compostos KH₂PO₄ e NaHCO₃ têm de ser esterilizados à parte dos outros componentes do meio. [18]

Para o cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides* foi usado um meio orgânico simples (MCS) que continha por litro: 10g Glucose; 2g de Extracto de levedura; e 3g de Sal do mar Vermelho, Red Sea™. O pH foi ajustado a 7,2 com a adição de NaOH.

No ensaio inicial onde se estudou diferentes fontes de carbono no cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides*, foi usado o meio de cultivo *standard* [19] com a seguinte composição em sais: 0,7g KH₂PO₄; 0,3g K₂HPO₄; 0,3g MgSO₄.H₂O; 0,003g FeSO₄.7H₂O; 0,1g glicina; 1ml de uma Solução de Elementos-Traço, já descrita anteriormente [18], e 10µg Vitamina B1, esterilizada por filtração e adicionada no fim da esterilização do restante meio, e onde a fonte de carbono foi variando, mantendo sempre o mesmo número de moles em carbono, nos seguintes compostos: 10g Glucose; 9,9g Lactose; 10,22g Glicerol; 13,66g Acetato de Sódio; e 9,9g de Xilose.

Em reactor, foi usado o meio MCS, e de forma a prevenir contaminações por bactérias foi adicionada uma mistura de 3 antibióticos (1 ml de antibióticos por 1l de cultura), com a seguinte composição por litro: 5mg Cloranfenicol; 62mg de Penicilina-G; e 100mg de

Estreptomicina; e foi também adicionado um anti-espuma, polipropilenoglicol (PPG), numa concentração de 200 µl por litro de cultura. A mistura de antibióticos e o anti-espuma já foram testados anteriormente e não afectam o crescimento da microalga nem a densidade máxima de biomassa [5].

O cultivo da levedura *Rhodotorula glutinis*, foi realizado em meio utilizado por Yoon e Rhee para limitação de carbono (MYR), com a seguinte composição por litro: 0,134g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,73g MgSO_4 ; 2g NaH_2PO_4 ; 7g KH_2PO_4 ; 0,5g Extracto de levedura; 1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; e 10g glucose [20]. No reactor foi adicionado anti-espuma, PPG, numa concentração de 100 µl por litro de cultura. Tal como no caso do cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides*, o anti-espuma já foi testado anteriormente e não afecta o crescimento da levedura.

Todos os meios foram esterilizados em autoclave, durante 20 minutos a uma temperatura de 120°C e 1 atm.

2.3. Estudo do crescimento de *Chlorella protothecoides* heterotrófica em diversas fontes de carbono

Para estudar o crescimento de *Chlorella protothecoides* em diversas fontes de carbono em cultivo heterotrófico, foram testadas as seguintes fontes de carbono: glucose, lactose, acetato de sódio, glicerol e xilose.

Este ensaio foi realizado em *erlenmeyers* de um litro, contendo cada um 400ml de cada meio, sendo que estes já foram esterilizados previamente em autoclave a 120°C e 1atm, durante 20 minutos. Cada fonte de carbono foi realizada em duplicado. Procedeu-se à inoculação, numa razão de inoculação de 10%, isto é de 40ml, onde o pré inóculo foi preparado em meio MCS a partir de *Chlorella protothecoides* heterotrófica do banco de algas heterotrófico, e mantida na incubadora Unitron (HT INFORS), durante 2,5 dias a 28°C e 150 rpm, no escuro.

O crescimento foi acompanhado durante 8 dias, onde os *erlenmeyers* foram mantidos, no escuro, na incubadora nas mesmas condições do pré inóculo. Diariamente foram recolhidas amostras de 20ml de cultura para analisar o crescimento, medir o pH (Series inoLab (WTW)), determinar o consumo de cada fonte de carbono e ainda observação microscópica para verificar possíveis contaminações por outros microrganismos.

2.4. Cultivo de *Chlorella protothecoides*

2.4.1. Autotrófico

O fotobioreactor (FBR) usado para o cultivo autotrófico de *Chlorella protothecoides*, esquematizado na Figura 2.1., é um FBR vertical alveolar, que suporta cerca de 2,7 litros de suspensão celular de microalga.

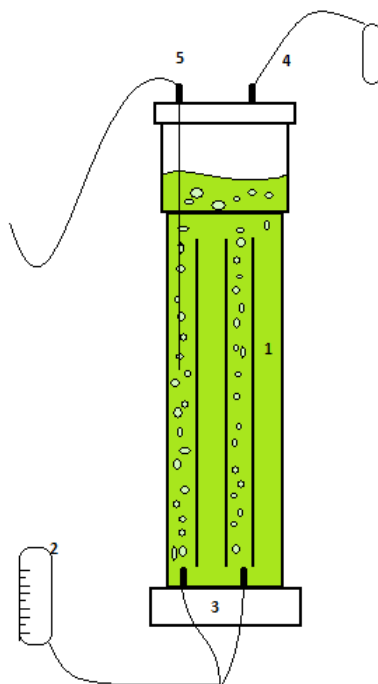


Figura 2.1.: Esquema de um fotobioreactor (FBR) vertical alveolar para o cultivo autotrófico de microalgas. (1) Suspensão celular; (2) Rotâmetro; (3) Entrada de ar comprimido; (4) Saída de ar; (5) Saída da amostra para análise.

Na parte inferior do FBR faz-se a entrada de ar comprimido, que é controlada pelo rotâmetro, as bolhas que surgem fazem agitar a suspensão celular não deixando que haja deposição de células na parede do FBR.

Este FBR foi preenchido com 2,2 litros de meio MCV, e o restante volume preenchido com 500ml de pré inóculo. O pré inóculo é obtido em coluna de bolhas com 600ml de meio MCV e cerca de 100ml de suspensão de *Chlorella protothecoides*, retirada do banco de algas autotrófico, e é mantido a 28°C e na presença de luz durante 4 dias, para se obter células em fase exponencial de crescimento.

Diariamente foi registada a concentração de oxigénio dissolvido e temperatura através de um eléctrodo específico (Oxi 197-S (WTW)), em apenas num dos FBR, e foram recolhidas amostras de cerca de 20ml de volume para analisar o crescimento da cultura, medir o pH (Series inoLab (WTW)), determinar o consumo de nitratos, e ainda para observação microscópica, de modo a verificar o aspecto da cultura e possíveis contaminações.

Além das análises feitas à suspensão celular foi também medida a composição da corrente gasosa de entrada e saída do FBR, em CO₂ e O₂, e respectivo caudal volumétrico de ar, através de um analisador de gases (Servomex 1440).

O volume de líquido do FBR, que devido a evaporações vai diminuindo, foi mantido constante adicionando água destilada diariamente.

2.4.2. Heterotrófico

O crescimento heterotrófico de *Chlorella protothecoides* foi realizado num fermentador Setric Genie Industriel (SGI Set 002) de 2 litros, esquematizado na Figura 2.2..

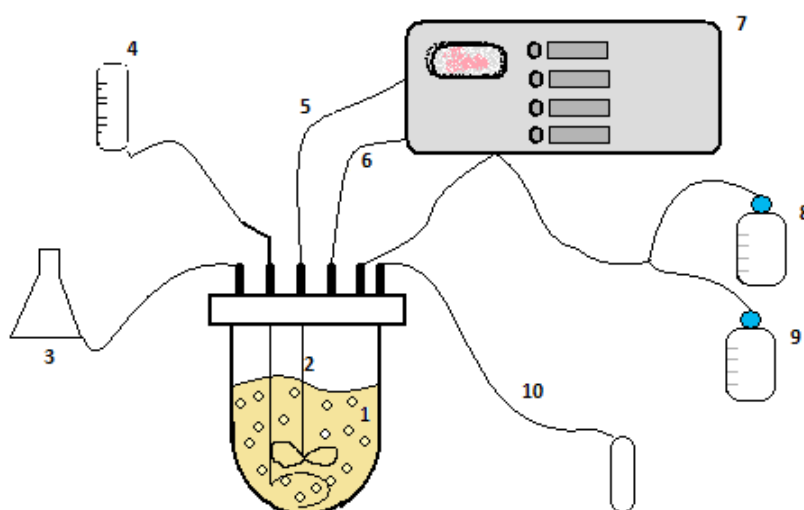


Figura 2.2.: Esquema de um fermentador para cultivo heterotrófico de microalgas. (1) Suspensão celular; (2) Agitador; (3) Fonte de alimentação; (4) Rotâmetro para a entrada de ar comprimido; (5) Medidor de pH; (6) Medidor de Oxigénio dissolvido; (7) Controlador; (8) Ácido; (9) Base; (10) Saída de ar.

O fermentador para cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides*, é um reactor complexo com várias entradas a controlar. Seguindo a Figura 10, o fermentador possui uma entrada de ar comprimido, estéril por um filtro de ar, que é controlada por um rotâmetro, onde as bolhas de ar formadas vão ajudar na agitação da cultura; uma entrada de uma fonte de alimentação, uma vez que o ensaio a decorrer é em semi-contínuo; e tem um controlador que controla vários parâmetros dentro do fermentador.

O controlador, SGI Seteric Genie Industriel, está ligado a um eléctrodo de oxigénio dissolvido InPro 3030/325 (METTLER-TOLEDO, Suíça), e a um eléctrodo de pH InPro 3030/225 (METTLER-TOLEDO, Suíça), como o controlador está programado para um *set-point* de pH, consegue assim com o ácido e a base controlar o pH da cultura a um pH desejado. Este controlador controla ainda a temperatura dentro do fermentador, também através de um *set-point*, e as rotações do agitador.

Para começar a fermentação, o fermentador foi devidamente lavado com ácido acético e água destilada. Os elétrodos de O₂ dissolvido e pH devem ser ligados ao controlador e deixados dentro de água destilada durante, pelo menos, 6 horas até polarizarem, e só depois calibrados. O controlador foi configurado para os seguintes *set-point*: temperatura a 28°C, pH a 7,2, rotações a 200 rpm e o caudal de ar de entrada de 50 l/h.

À parte foi preparado 1 litro de HCl 1M e 1 litro de NaOH 1M, e colocados em frasco próprio, para o controlo do pH durante a fermentação. E como a fermentação é em semi-contínuo foi também necessário preparar 500 ml de uma fonte de alimentação que consiste em meio MCS concentrado 10 vezes.

Dentro do fermentador foi colocado 700ml de meio MCS, com o anti-espuma, todas as ligações, entradas e saídas de ar e frascos de ácido e base, foram feitas e isoladas com algodão e papel de alumínio, todos os tubos de ligação foram fechados com pinças, mas deixou-se uma abertura no topo do fermentador para equilibrar as pressões, colocou-se tudo na autoclave, e deixou-se esterilizar durante 30 minutos a 120°C e 1 atm.

Passado o tempo de esterilização deixou-se arrefecer tudo até à temperatura ambiente, com o tubo de saída de ar aberto e a entrada de ar com um pequeno caudal para que a pressão seja positiva dentro do fermentador. Assim que o fermentador ficou frio, adicionou-se 1 ml de solução de antibióticos, esterilizada por filtração, usando uma seringa com agulha estéril. Em seguida procedeu-se à inoculação, pelo mesmo método de seringa e agulha estéril, numa razão de inoculação de 10 % (volume), isto é 70ml. O pré inóculo foi preparado em meio MCSa a partir de *Chlorella protothecoides* heterotrófica do banco de algas heterotróficas, e mantida na incubadora a 28°C e 150 rpm, no escuro, durante 3 dias para se obter células na fase exponencial de crescimento.

Na fermentação heterotrófica de *Chlorella protothecoides* é essencial que a cultura não apanhe luz, para fazer unicamente respiração e não fotossíntese, assim, o reactor foi completamente tapado com papel de alumínio.

Para além da monitorização da cultura pelo controlador, onde podemos registar diariamente as rotações do agitador, a temperatura, o pH e o oxigénio dissolvido, foi realizada uma amostragem também diária, onde foi retirado da cultura uma amostra com cerca de 15ml no início do ensaio, e quando a biomassa ficou mais concentrada apenas um volume de 5ml. A amostra foi analisada em termos de crescimento da cultura, determinação do consumo de glucose, observação microscópica, a 1000 vezes, que é bastante importante neste tipo de fermentação, uma vez que é bastante propícia a contaminações com bactérias, e ainda analisada por citometria de fluxo, para verificação da viabilidade celular e do conteúdo em lípidos.

Além das análises feitas à suspensão celular, foi também medida a composição da corrente de gases à entrada e saída do fermentador, em O₂ e CO₂, e o respectivo caudal volumérico de ar.

Quando a biomassa no fermentador atingiu a fase estacionária, isto é, quando a glucose se esgotou, iniciou-se a alimentação, através de uma estratégia escalonada, com um caudal exponencial para manter a taxa de crescimento constante.

2.5. Cultivo de *Rhodotorula glutinis*

O cultivo de *Rhodotorula glutinis* foi realizado no mesmo fermentador do cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides*, o fermentador Setric Genie Industriel (SGI Set 002) de 2 litros, esquematizado na Figura 2.2..

Começou-se a fermentação do mesmo modo que a de cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides*, e configurou-se o controlador para os seguintes *set-points*, temperatura a 30°C, pH a 5,5, rotações a 453 rpm e o caudal de ar de entrada de 78 l/h.

Tal como no cultivo anterior, foi preparado à parte 500ml de HCl 2M e 500ml de NaOH 2M, para o controlo do pH.

No fermentador foi colocado 1300ml de meio MYR, com o anti-espuma, e de seguida foram tomadas as mesmas medidas, que na fermentação de *Chlorella protothecoides*, para proceder à sua esterilização.

Após o tempo de esterilização, deixou-se arrefecer à temperatura ambiente, com o tubo de saída de ar aberto e a entrada de ar com um pequeno caudal para que a pressão seja positiva no interior do fermentador.

Assim que estava frio, procedeu-se à inoculação, numa razão de inoculação de 10% (volume), isto é 130ml de pré inoculo, usando um balão *erlenmeyer* com tubuladura inferior, que se ligou ao fermentador. O pré inóculo foi preparado a partir de cultura de 3 rampas com meio YMAgar, que estiveram a incubar 3 dias a na estufa a 30°C, posteriormente a cultura dessas 3 rampas foi transferida para 300 ml de meio de limitação de carbono, e foi a incubar durante 24 horas a 30°C com agitação de 120 rpm.

A amostragem foi feita de 2 em 2 horas em condições de assepsia, onde se retirou um volume de cultura de cerca de 12,5ml. Este volume de amostra serviu para analisar o crescimento celular da cultura, determinação do consumo de amónia e de glucose, e ainda analisar por citometria a viabilidade celular da cultura e o conteúdo em lípidos.

Tal como nos cultivos de *Chlorella protothecoides*, também foi medida a composição da corrente de gases à entrada e saída do fermentador, em O₂ e CO₂, e o respectivo caudal volumétrico de ar, no mesmo analisador de gases.

Quando a biomassa atingiu a fase estacionária, o consumo de glucose deu-se por completo. Nestas condições deu-se como terminada a fermentação.

2.6. Simbiose

De modo a estudar a simbiose entre as culturas auto e heterotróficas de *Chlorella protothecoides* foram realizados dois ensaios essenciais, o primeiro deles onde a corrente gasosa de saída do FBR é a corrente de entrada no fermentador, e um segundo onde a corrente gasosa de saída do fermentador é a corrente de entrada no FBR.

As condições de cultivo de ambas as culturas, auto e heterotróficas, são precisamente as descritas anteriormente, mas é de realçar que no primeiro ensaio, que ocorreu no sentido FBR->Fermentador, o FBR era um fotobioreactor vertical alveolar, já existente no laboratório, de menores dimensões, com apenas 2 alvéolos, tendo uma capacidade de 600ml de cultura, que operou de modo idêntico ao FBR descrito anteriormente, à excepção do caudal de ar de entrada que foi de 72 l/h.

No segundo ensaio, que ocorreu no sentido Fermentador ->FBR, já foi utilizado o FBR vertical alveolar descrito na secção anterior, operando sempre nas mesmas condições.

Na simbiose entre as culturas autotrófica de *Chlorella protothecoides* e heterotrófica de *Rhodotorula glutinis*, foram também realizados dois ensaios, à semelhança da simbiose anterior, o primeiro onde a corrente de saída do FBR é a corrente de entrada do fermentador e um segundo ensaio onde a corrente de saída do fermentador é a corrente de entrada do FBR.

Também nesta simbiose, ambos os ensaios ocorreram nas mesmas condições descritas nas secções anteriores.

Esta foi a estratégia adoptada para demonstrar a simbiose, onde se optou por ensaios com uma só ligação da corrente gasosa num dos sentidos, variando apenas a posição dos bioreactores por simplicidade de operação

2.7. Métodos Analíticos

2.7.1. Análise do crescimento

O crescimento de *Chlorella protothecoides*, quer autotrófico, quer heterotrófico, foi monitorizado diariamente, com medição da densidade óptica das culturas a 540nm, no espectrofotómetro Thermo Spectronic génesis 20 (THERMO SCIENTIFIC, Estados Unidos), e através da determinação de peso seco, onde se filtrou um volume rigoroso de cultura entre 5 a 10ml de amostra em filtros de fibra de vidro, previamente tarados, e deixados na estufa a 100°C durante 24 horas, e onde o sobrenadante filtrado foi guardado no congelador para posterior análise de nitratos e glucose. Ambas as medidas foram realizadas em duplicado.

O crescimento da *Rhodotorula glutinis*, foi monitorizado de 2 em 2 horas, com medição da densidade óptica da cultura a 600nm, no espectrofotómetro, e com a determinação de peso seco, onde se usou filtros de nitrocelulose de 0,2 µm de poro, previamente tarados, para filtrar rigorosamente 5 a 10 ml de cultura, onde de seguida foram deixados na estufa a 100°C durante 24 horas, e onde o sobrenadante filtrado foi guardado no congelador para posterior análise de amónia e glucose. Também neste crescimento, ambas as medidas foram realizadas em duplicado.

2.7.2. Determinação da glucose

A glucose contida no meio, quer da cultura heterotrófica de *Chlorella protothecoides*, quer da cultura de *Rhodotorula glutinis*, foi analisada através do sobrenadante obtido da filtração, para a determinação do peso seco, pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) [21]. A medição da absorvância foi efectuada a 550nm no espectrofotómetro Thermo Spectronic génesis 20 (THERMO SCIENTIFIC, Estados Unidos), em células de 1cm de percurso óptico. Cada amostra foi analisada em duplicado.

2.7.3. Determinação de nitratos

Para a determinação dos nitratos contidos no meio inorgânico de cultivo de *Chlorella protothecoides*, foi usado o método espectroscópico ultravioleta, através do sobrenadante obtido da filtração para a determinação do peso seco. É de salientar que neste método só se pode usar água Millipore, isto é, sem nitratos para que não haja interferência. A leitura da absorvância foi feita no espectrofotómetro ultravioleta U-2000 Spectrophotometer (HITACHI),

contra água Millipore, em cuvetes de QS, quartzo sílica, com 1cm de percurso óptico, nos comprimentos de onda 220nm e 275nm [22].

2.7.4. Determinação da amónia

A quantidade de amónia no meio de cultivo de *Rhodotorula glutinis*, foi determinada através do sobrenadante obtido da filtração para a determinação do peso seco, pelo kit Spectraquant Ammonium Cell Test (MERCK, Alemanha), onde a absorvância foi medida a 690 nm no espectrofotómetro Thermo Spetronic génesis 20 (THERMO SCIENTIFIC, Estados Unidos), em células de 1cm de percurso óptico.

2.7.5. Quantificação de lípidos e viabilidade celular

As análises de citometria de fluxo foram processadas pelo citómetro de fluxo FACScan (BD INSTRUMENTS, Bélgica).

A análise de citometria a amostras de *Chlorella protothecoides*, tanto auto como heterotrófica, seguem o mesmo procedimento.

Em primeiro lugar, as amostras devem ser sonicadas, em banho de ultrassons não destrutivos durante 10 segundos, em seguida a concentração de cada amostra é ajustada por diluição com tampão PBS, para um volume de 1ml, de modo a que o número de eventos por segundo seja entre 250 a 300.

A percentagem de células mortas foi obtida através da fluorescência emitida pelas células coradas com PI. A 1ml de amostra diluída com PBS, foram adicionados 5 µl de solução stock de PI, com uma concentração de 2 mg/ml.

A análise do conteúdo em lípidos foi conseguida através da fluorescência das células efectuada pelo corante NR, na qual foram adicionados 20µl de solução NR em 1ml de amostra diluída com PBS, agitada vigorosamente e incubada durante 2 minutos a 37°C

A análise de citometria das amostras de *Rhodotorula glutinis* foram processadas de maneira igual às amostras de *Chlorella protothecoides*, à excepção do número de eventos por segundo, que nesta levedura é entre 800 e 1000, e o tempo de incubação da amostra com corante NR é de 30 segundos, em vez de 2 minutos [11].

3. Resultados e Discussão

3.1. Estudo de *Chlorella protothecoides* heterotrófica em meio com diferentes fontes de carbono orgânico

O ensaio do estudo do crescimento de *Chlorella protothecoides* em meio com diferentes fontes de carbono foi realizado de modo a se perceber qual seria a melhor fonte de carbono onde esta microalga, *Chlorella protothecoides*, conseguiria atingir melhores resultados tanto no seu crescimento como na sua produtividade.

Na figura seguinte, Figura 3.1., está representado o crescimento de *Chlorella protothecoides* sob condições heterotróficas em meio com diferentes fontes de carbono.

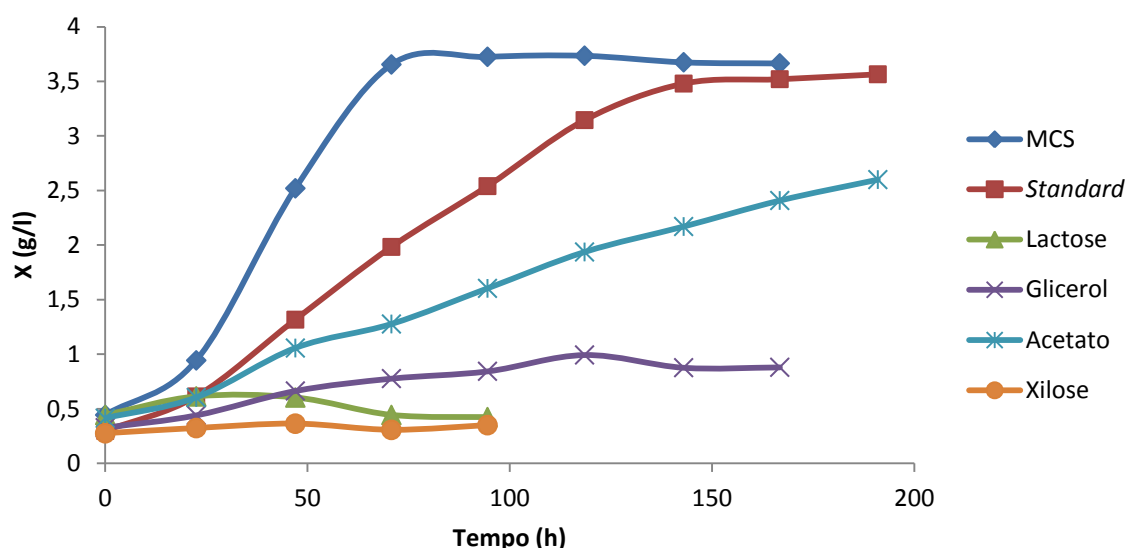


Figura 3.1.: Gráfico esquemático do crescimento de *Chlorella protothecoides* em erlenmeyers agitados, em 5 fontes de carbono diferentes, glucose, lactose, glicerol, acetato e xilose.

Como se pode observar pela figura 3.1., o crescimento não foi bem sucedido para várias fontes de carbono. Os parâmetros de crescimento calculados foram muito diferentes. Neste ensaio para comparação de fonte de carbono, foram calculados as taxas de crescimento (ANEXO 1), a biomassa máxima atingida, a produtividade máxima em biomassa (ANEXO 2), o rendimento de biomassa em relação ao substrato (ANEXO 3), para o meio MCS e Standard, e ainda calculado a taxa volumétrica de consumo de glucose (ANEXO 4) para os mesmos dois meios. A tabela seguinte, Tabela 3.1., mostra-nos os parâmetros calculados para este ensaio,

Tabela 3.1.: Parâmetros de crescimento no ensaio das diferentes fontes de carbono testadas.

	μ (h ⁻¹)	X_{\max} (g/l)	Px_{\max} (g.l ⁻¹ .d ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	r_{Glu} (g.l ⁻¹ .d ⁻¹)
MCS	0,037	3,74	1,54	0,31	3,36
Standard	0,032	3,56	0,69	0,28	1,92
Acetato	0,020	2,60	0,44	-----	-----
Glicerol	0,015	0,99	0,22	-----	-----
Lactose	0,006	0,61	0,18	-----	-----
Xilose	0,006	0,36	0,05	-----	-----

Começando por analisar as taxas de crescimento, verificamos que o melhor crescimento foi no meio MCS, seguido pelo meio Standard, ou seja os dois meios com glucose, depois o Acetato e o Glicerol, que apresentam taxas de crescimento intermédias, e por fim a Lactose e a Xilose que não apresentam praticamente nenhum crescimento.

A biomassa máxima atingida e a produtividade máxima em biomassa, coincidem com as taxas de crescimento, sendo que a biomassa mais elevada atingida nos seis ensaios foi de 3,73 g/l e a produtividade máxima atingida em biomassa também nos seis ensaios foi de 1,54 g/l.d, ambos no meio MCS, seguindo-se o meio Standard com 3,57 g/l e 0,69 g/l.d, em biomassa máxima e produtividade máxima em biomassa, respectivamente.

Nos meios de Acetato e Glicerol, a alga mostra-nos parâmetros sempre mais baixos. Isto pode dever-se ao facto de alga não estar adaptada a este tipo de fontes de carbono, isto é, como a alga é repicada e mantida no banco de algas sempre em meio MCS está adaptada a este meio, e daí o seu crescimento ser o que apresenta melhores resultados, quando passa para uma nova fonte de carbono estranha, leva algum tempo de adaptação, o que se pode reflectir numa curva de crescimento muito linear, como é mostrado na figura 3.1.

Já nos meios de Lactose e Xilose, a alga revela uma incapacidade de reprodução, que se pode dever, ou a uma fase de adaptação a este tipo de fontes de carbono mais alargada, como nos dois casos anteriores, ou mesmo ainda devido a falta de enzimas específicas, que degradem estas fontes de carbono [8].

Neste últimos quatro meios, Acetato, Glicerol, Lactose e Xilose, é ainda de referir que o crescimento pode não ter sido bem sucedido devido a um excesso de fonte de carbono, uma vez que a alga não estava adaptada a este tipo de meio, nomeadamente o Acetato e o Glicerol que podem ser consumidos por algumas espécies de algas, mas se estiverem em baixas concentrações [8].

No entanto, durante o ensaio também foram medidos os valores de pH, apresentados na Figura 3.2., que também pode ser um parâmetro importante no crescimento da microalga.

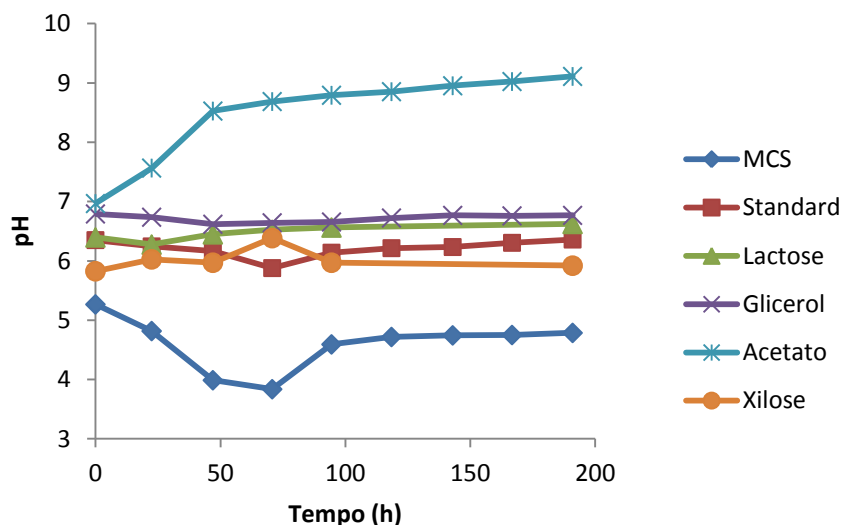


Figura 3.2.:Gráfico esquemático da variação do pH ao longo do tempo, nos meios com diferentes fontes de carbono.

Como pode ser observado pela figura anterior, a maioria dos meios mantém o pH mais ou menos constante ao longo de todo o ensaio, cerca de pH 6,5, com excepção do meio com Acetato e do meio MCS.

Quanto ao meio com Acetato, o pH deste vai ficando alcalino com o crescimento de biomassa, o que pode ser a causa pela qual a curva de crescimento é típica de uma inibição, uma vez que a alga pode estar a ser inibida pelo excesso de alcalinidade do meio, levando a um crescimento mais lento.

Pelo contrário, no meio MCS o pH vai ficando ácido com o crescimento de biomassa, sendo visível uma pequena subida de pH quando o crescimento atinge a fase estacionária. Este perfil de pH pode indicar que, o crescimento foi bem sucedido, apesar do pH óptimo de crescimento de *Chlorella protothecoides* ser 7,2.

Para além do controlo do pH, a amostra recolhida diariamente serviu também para analisar a quantidade de açúcar consumido, mas apenas se verificou no caso da glucose, no meio MCS e no meio Standard, uma vez que as culturas de Lactose e Xilose não obtiveram um bom crescimento. Para os meios com Acetato e Glicerol, o consumo de substrato devia ter sido feito através do método TOC, *Total Organic Carbon*, mas uma vez que, tal como nos dois casos anteriores, não houve um bom crescimento, esta fonte de carbono deixou de ter interesse e por isso já não se foi verificar o consumo destes dois substrato.

Na figura 3.3., esta representado o consumo de glucose ao longo do tempo, nos meios MCS e Standard,

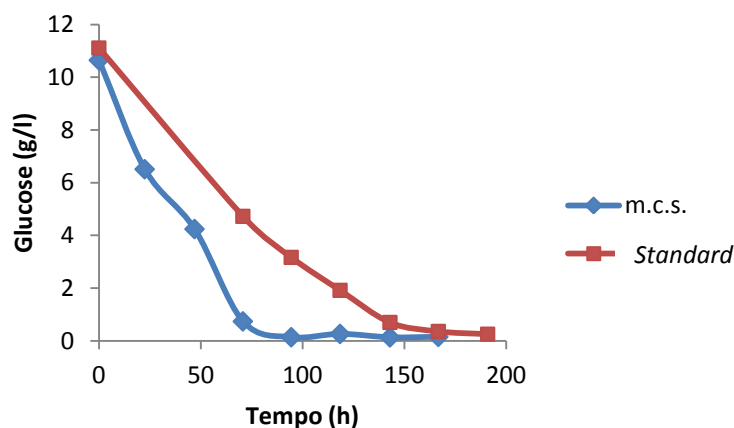


Figura 3.3.: Gráfico esquemático da variação da concentração de glicose no meio MCS e meio Standard ao longo do tempo, no ensaio das fontes de carbono

Como se pode verificar pela observação da figura anterior, a taxa volumétrica de consumo de glicose é maior no meio MCS do que no meio Standard, $3,36 \text{ g.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $1,92 \text{ g.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente.

Além disso o rendimento de biomassa em relação ao substrato, também é maior no meio MCS do que no meio Standard, $0,31 \text{ g biomassa/g glicose}$ e $0,28 \text{ g biomassa/g glicose}$, respectivamente, o que seria de esperar uma vez que no meio MCS foi atingida mais biomassa no fim do ensaio, e com a mesma quantidade de glicose inicial.

Pode então concluir-se que o melhor meio de crescimento heterotrófico de *Chlorella protothecoides* é o meio MCS, um meio onde se obtêm os melhores parâmetros de crescimento e de produtividade, e que por ser um meio simples faz com que os custos de produção sejam mais baixos, apresentando assim mais uma vantagem a nível de sustentabilidade. No entanto não é de se excluir as outras fontes de carbono, uma vez que têm potencial para tal.

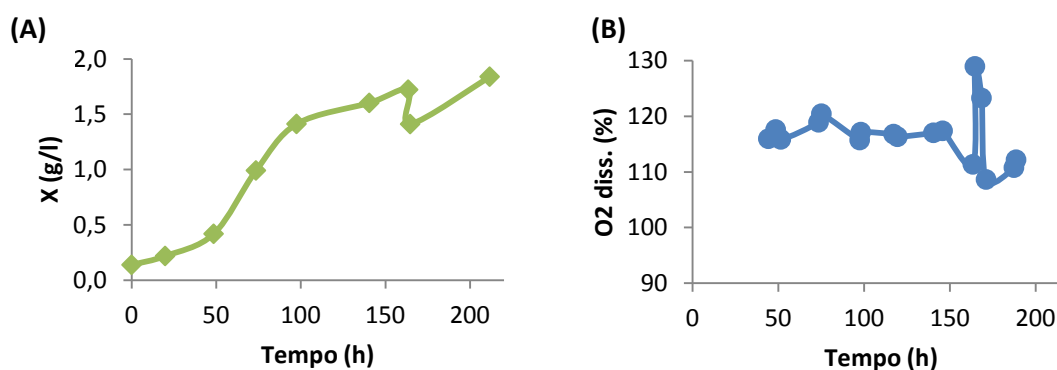
3.2. Estudo da simbiose por troca gasosa entre *Chlorella protothecoides* autotrófica e heterotrófica

Uma vez que a melhor e mais rentável fonte de carbono estava testada, meio MCS, iniciou-se então o estudo da simbiose por troca gasosa entre *Chlorella protothecoides* auto e heterotrófica, de modo a obter ainda melhores resultados.

Foram realizados dois ensaios, o primeiro onde a corrente gasosa de saída do FBR é a corrente de entrada no fermentador, e o segundo onde a corrente gasosa de saída do fermentador é a corrente de entrada no FBR.

3.2.1. FBR -> Fermentador

O primeiro ensaio que ocorre no sentido de fornecimento de ar rico em O₂, proveniente do FBR, para o fermentador, foi realizado nas condições que são descritas nos materiais e métodos, excepto que as dimensões do FBR utilizado foram mais reduzidas, neste caso com apenas 2 alvéolos e capacidade de 600ml de cultura, sendo por isso que o caudal de ar de entrada foi de 72 l/h e a temperatura média do ensaio de 22°C. A figura seguinte, Figura 3.4., representa a evolução dos parâmetros medidos ao longo do desenvolvimento de *Chlorella protothecoides* autotrófica, em meio inorgânico:



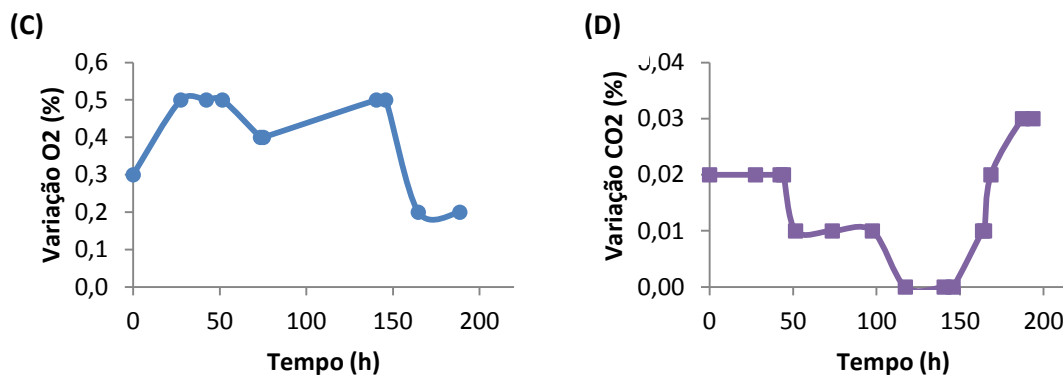


Figura 3.4.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições autotróficas. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação da percentagem de oxigénio dissolvido no meio; (C) Variação da percentagem de O₂; (D) Variação da percentagem de CO₂.

O ensaio teve a duração de cerca de 8 dias (188 horas), e foi realizado em semi-contínuo, onde às 164 horas foi retirado um volume de 150 ml de cultura do FBR, e reposto com meio MCV concentrado duas vezes, de modo a repor os níveis de nitratos no meio, no entanto neste ensaio não temos análise ao consumo de nitratos.

O crescimento foi bem sucedido, onde se conseguiu atingir um máximo de 1,8 g/l de biomassa, como se pode observar pelo gráfico (A) da Figura 3.4.. Este valor de biomassa está muito próximo do atingido por Carla Santos e Alberto Reis [5], 2 g/l, numa coluna de bolhas de 900 ml de volume.

Pela observação do gráfico (A) da Figura 3.4., podemos ainda diferenciar uma fase de latência muito curta, de apenas 20 a 30 horas, o que demonstra que apesar de o ensaio ter começado com uma densidade celular baixa, 0,138 g/l, a alga teve uma boa adaptação ao FBR, começando logo a crescer a uma boa velocidade, o que significa que, em especial, a intensidade luminosa e o caudal de ar de entrada eram os adequados.

A taxa de crescimento (μ) obtida foi de $0,028h^{-1}$, o que demonstra ser uma taxa baixa para este tipo de reactor, uma vez que já se conseguiu atingir taxas de crescimento de $0,037h^{-1}$ em colunas de bolhas [5]. Uma vez que estamos perante um fotobioreactor vertical alveolar, seria de esperar que a taxa de crescimento fosse superior à taxa obtida em colunas de bolhas, pois este reactor tem uma melhor agitação com bolhas de menor dimensão, que proporciona uma melhor transferência de massa.

A variação de produtividade de biomassa (P_x) também foi calculada para este ensaio apresentando produtividades crescentes até um máximo de 0,31 g/l.d, atingido em plena fase exponencial, começando depois a decrescer lentamente.

Quanto ao gráfico (B) da Figura 3.4, este representa o conteúdo de oxigénio dissolvido no meio, onde podemos observar pequenas variações ao longo do tempo. Apesar de

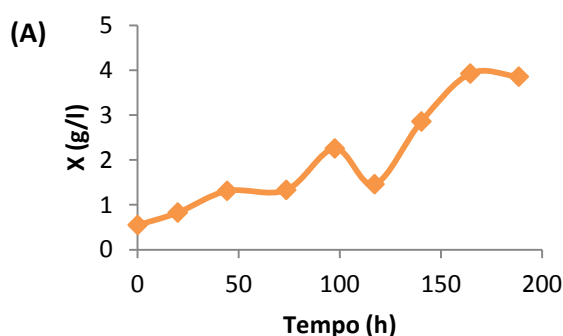
apresentar uma ligeira variação, e não apenas um aumento gradual, consequente do aumento da biomassa. Os valores de oxigénio estão sempre acima do valor de saturação de oxigénio dissolvido em água à temperatura de 25°C, que é de 8,46 mg/l [23], o que mostra que houve um aumento de oxigénio devido ao crescimento de biomassa microalgal, atingindo o seu máximo às 164 horas, de 129% da saturação do oxigénio em água.

De seguida, esta produção de oxigénio diminui, devido ao facto das células se encontrarem em fase estacionária, até que volta a ter uma ligeira subida quando se retira cultura e adiciona meio fresco, repondo os nutrientes no meio, fazendo com que haja novo crescimento celular e mais produção de oxigénio.

Os gráficos (C) e (D), da Figura 3.4, dizem respeito à variação de O_2 e CO_2 , na corrente gasosa. A variação de oxigénio está de acordo com o gráfico (B), que vai aumentando ao longo do tempo, uma vez que a densidade celular também aumenta, atingindo o seu valor máximo de 0,5%.

Quanto à variação de CO_2 , este tem um comportamento inesperado uma vez que começa com um consumo mais elevado na fase de latência do que na fase exponencial, o que não é de esperar, uma vez que o máximo consumo da fonte de carbono deve ser durante a fase de maior crescimento, fase exponencial. Quando atinge a fase estacionária deixa de consumir, o que é normal, e quando se inicia o regime semi-contínuo volta a consumir novamente o CO_2 , até um máximo de 0,03%.

O crescimento heterotrófico de *Chlorella protothecoides*, no fermentador, que recebeu ar rico em oxigénio, vindo da corrente de saída do FBR descrito anteriormente, está representado na Figura 3.5 onde também está representada a evolução de vários parâmetros medidos ao longo de todo o ensaio,



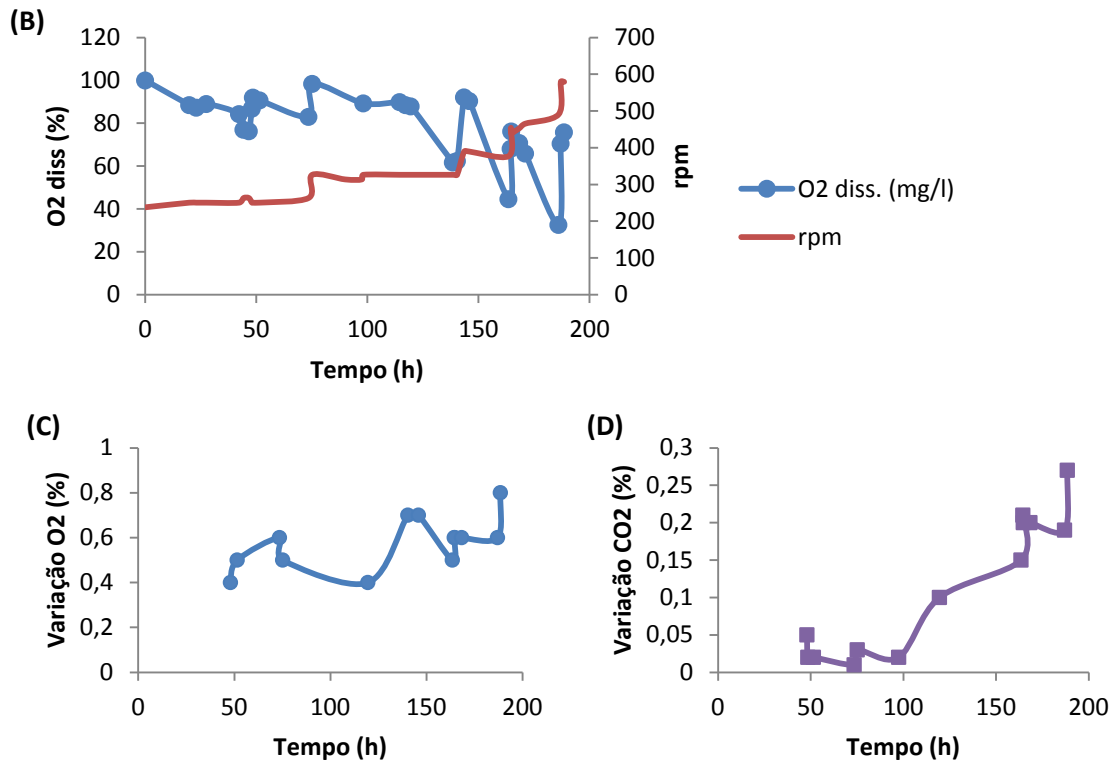


Figura 3.5.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições heterotróficas. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação da percentagem de oxigénio dissolvido no meio (linha azul), e variação das rotações, rpm, (linha vermelha); (C) Variação da percentagem de O₂; (D) Variação da percentagem de CO₂.

Tal como no FBR, o ensaio teve a duração de 8 dias, onde o controlador ligado ao fermentador, monitorizou as rotações a 300 rpm, a temperatura a 28°C, o pH a 7,2, e ainda a concentração de oxigénio dissolvido no meio de cultura, e onde o caudal de ar de entrada foi a corrente de saída do FBR.

O crescimento foi realizado em descontínuo seguido de semi-contínuo, onde foi adicionado 20 ml de fonte de alimentação de meio MCS concentrado dez vezes, todos os dias a partir do terceiro dia, ou seja, assim que atingiu a fase estacionária.

O crescimento foi bem sucedido, atingindo uma concentração máxima de biomassa de 6,9 g/l, o que é um valor apreciável para este tipo de reactor, uma vez que Carla Santos e Alberto Reis [5] atingiram 7 g/l em coluna de bolhas com 900ml, em simbiose com alga autotrófica também em coluna de bolhas.

Pela observação do gráfico (A) da Figura 3.5, pode-se constatar que não houve fase de latência, o que nos mostra que as células vindas do pré inóculo se adaptaram bem ao fermentador, crescendo de uma forma saudável, apesar de o ensaio ter começado com uma densidade celular baixa, de 0,5 g/l.

A taxa de crescimento (μ) aqui obtida foi de $0,020 \text{ h}^{-1}$, que demonstra ser baixa comparada com o artigo anteriormente referido [5], que nos mostra uma taxa de $0,0278 \text{ h}^{-1}$ para um crescimento heterotrófico de *Chlorella protothecoides* em colunas de borbulhamento a receber ar rico em O_2 vindo do crescimento da mesma alga cultivada de modo autotrófico, além de que o crescimento no tipo de reator utilizado no presente trabalho (FBR alveolar plano) seria de esperar que alcançasse melhores resultados, uma vez que o seu design oferece muito melhores condições de crescimento ao providenciar melhor aproveitamento de radiação, melhor mistura e, em consequência, menores gradientes e melhor transferência de massa de gases.

E ainda a produtividade máxima em biomassa foi de $0,49 \text{ g/l.d}$, o que, mais uma vez, é um valor muito baixo para uma alga que está em simbiose a receber ar rico em O_2 .

O gráfico (B) mostra-nos a variação de oxigénio dissolvido no meio, que à medida que a densidade celular ia aumentando o oxigénio dissolvido ia diminuindo. Como se pode observar pelos valores do gráfico, o oxigénio nunca esteve muito acima da saturação do meio, o que nos indica que o FBR não estava a produzir tanto oxigénio como era esperado. E devido ao consumo dentro do fermentador, de modo a que o oxigénio disponível não estivesse abaixo dos 40%, as rotações de agitação do meio tiveram de ser aumentadas, como mostra a linha vermelha do gráfico, assim, sempre que as rotações eram aumentadas o oxigénio disponível no meio aumentava também favorecendo o crescimento celular.

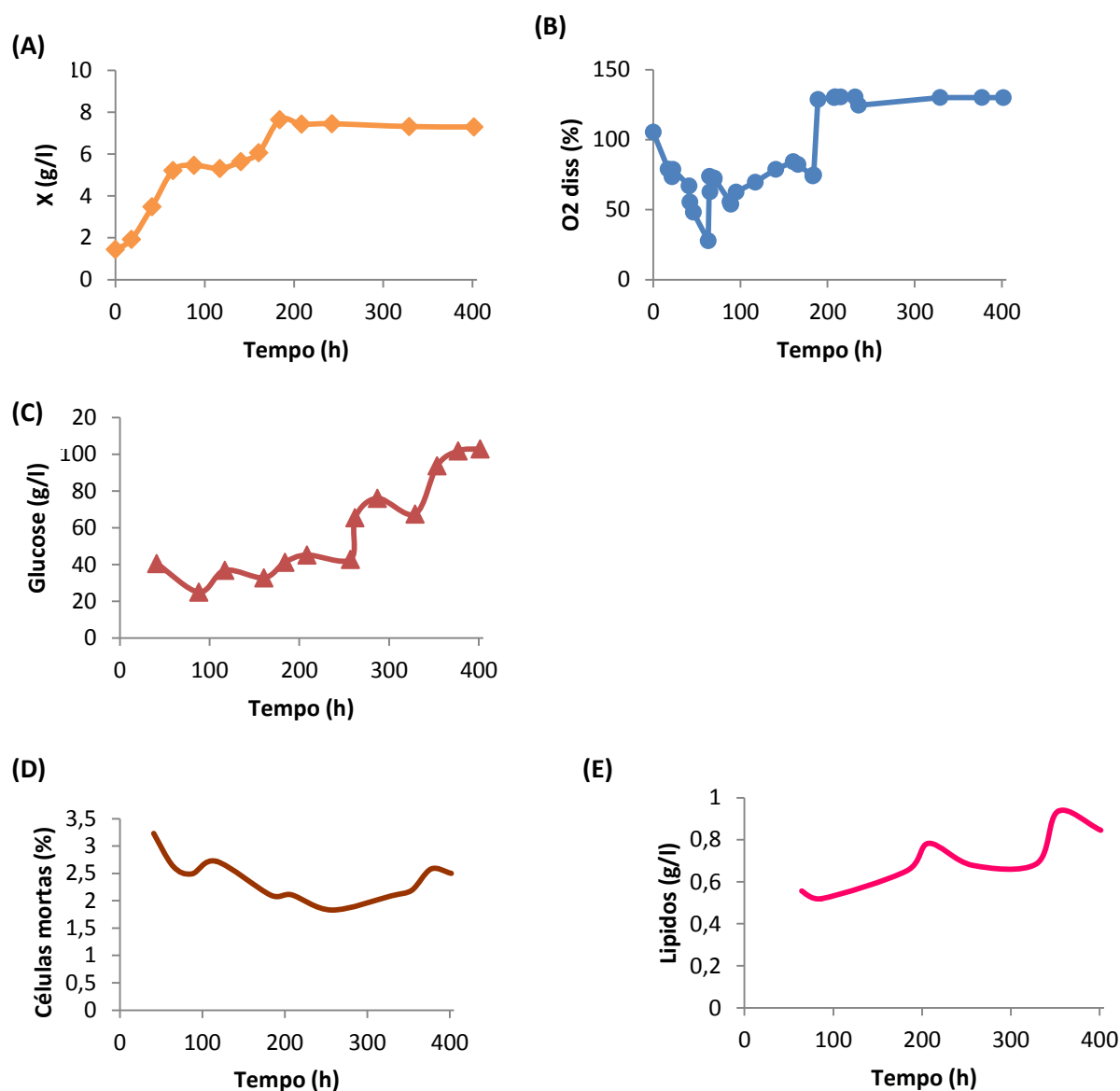
Os gráficos (C) e (D), da mesma figura, dão-nos informação sobre a variação de gases, O_2 e CO_2 , dentro do fermentador. O consumo de oxigénio acompanha o crescimento celular. E o aumento de CO_2 corrobora com o crescimento celular e a diminuição de oxigénio, uma vez que a produção de CO_2 é maior quanto maior é o consumo de oxigénio e consequentemente quanto maior é o crescimento celular.

Com estes dados apresentados e utilizando o artigo já referido [5] como controlo, podemos afirmar que a simbiose no sentido de fornecimento de ar rico em O_2 proveniente do FBR ao fermentador, FBR -> Fermentador, e nestas condições, não foi muito favorável para um melhor crescimento da alga *Chlorella protothecoides* heterotrófica, mostrando que não houve efeito positivo quer na taxa de crescimento, quer na produtividade em biomassa.

3.2.2. Fermentador -> FBR

O segundo ensaio realizado com simbiose entre a mesma espécie de *Chlorella protothecoides*, mas cultivada autotróficamente e heterotróficamente, é realizado no sentido de fornecimento de ar rico em CO₂ proveniente do fermentador, ao FBR, com capacidade para 2,7 l de cultura. Neste ensaio aumentou-se a concentração de glucose no meio para 50 g/l e de extracto de levedura para 5g/l e sal do Mar para 1g/l de modo a melhorar o crescimento heterotrófico.

A figura seguinte, Figura 3.6, representa a evolução dos parâmetros medidos ao longo do desenvolvimento de *Chlorella protothecoides* heterotrófica, em meio orgânico, MCS com 50g/l de glucose, no fermentador:



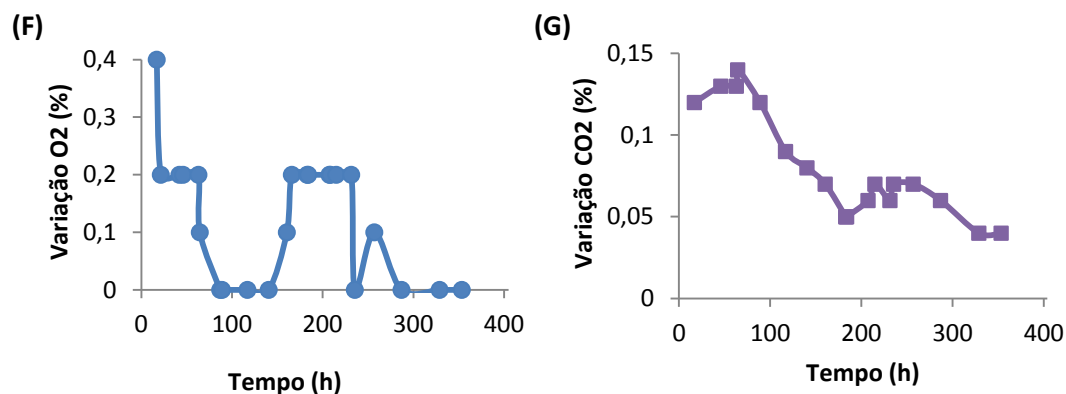


Figura 3.6.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições heterotróficas. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação da percentagem de oxigénio dissolvido no meio; (C) Concentração de glucose, g/l; (D) Percentagem de células mortas; (E) Concentração de lípidos, g/l; (F) Variação da percentagem de CO₂; (G) Variação da percentagem de O₂.

Este ensaio teve a duração de aproximadamente 16 dias, onde também foi realizado um controlo em erlemayer do cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides*, em meio MCS com a mesma composição que o meio do fermentador, inoculado a partir do mesmo pré-inóculo.

Na figura seguinte, Figura 3.7., estão representados alguns parâmetros monitorizados ao longo do crescimento heterotrófico em *erlenmayer*, operando em descontínuo,

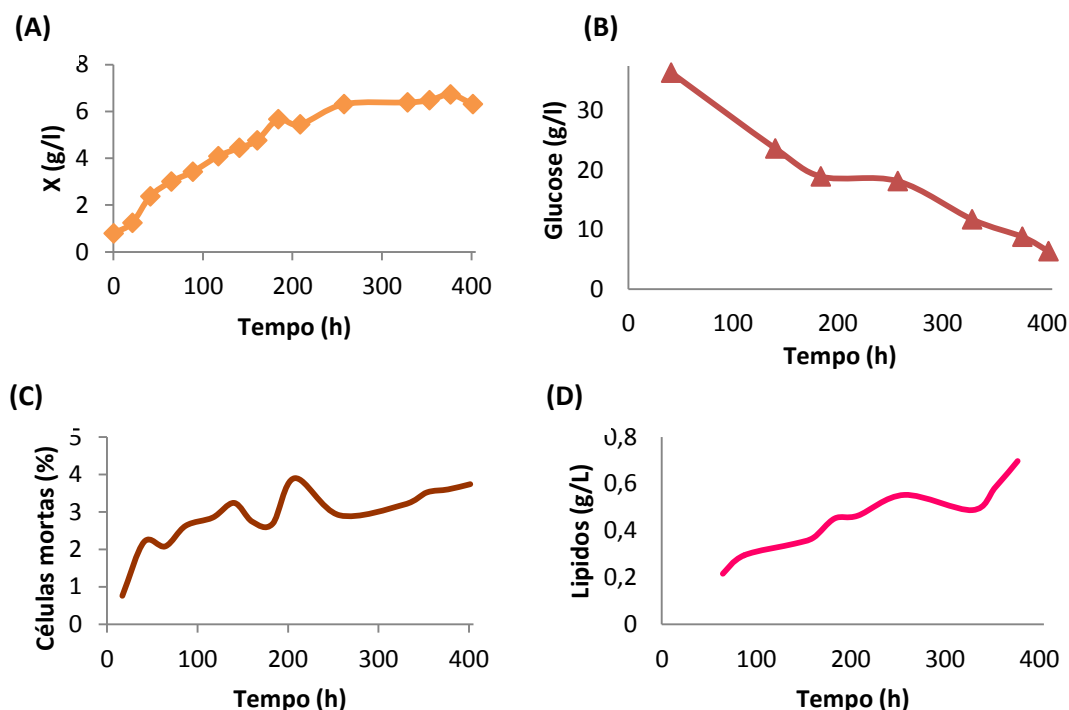


Figura 3.7.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições heterotróficas, em operação descontínua em *erlenmayer*. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação do pH; (C) Percentagem de células mortas; (D) Concentração de lípidos, g/l.

De modo a ser mais fácil a comparação dos dois reactores, do fermentador com o controlo em *erlenmayer*, está representado na tabela seguinte os parâmetros chave,

Tabela 3.4.: Parametros de crescimento de *Chlorella protothecoides*, em meio orgânico, em dois tipos de reactor, fermentador e erlenmayer.

	μ (h ⁻¹)	X_{\max} (g/l)	$P_{X\max}$ (g/l.d)	Lip_{\max} (% p/p)	$P_{lip.\max}$ (g/l.d)
Fermentador	0,021	7,6	2,17	26,5	0,091
Controlo (erlenmayer)	0,015	6,3	0,86	17,4	0,081

Começando por analisar o crescimento no fermentador, este foi realizado em descontínuo seguido de regime semi-contínuo, onde foi adicionado volumes de 10 e 20 ml de fonte de alimentação de meio MCS concentrado dez vezes, a partir do quinto dia, ou seja quando começou a atingir a fase estacionária.

O crescimento foi bem sucedido, onde a biomassa máxima atingida foi de 7,2 g/l, o que foi positivo em relação ao controlo, uma vez que este só atingiu 6,3 g/l, e ainda bastante positivo em relação à fermentação em simbiose apresentada anteriormente.

Pela observação do gráfico (A), da Figura 3.6, podemos verificar que não houve fase de latência o que nos mostra que a alga se adaptou bem ao fermentador, seguindo-se uma fase exponencial com um taxa de crescimento de 0,021 h⁻¹, que é bastante favorável em relação ao controlo, cuja taxa de crescimento é 0,015 h⁻¹, mostrando uma vantagem significativa na utilização de fermentador para cultivo heterotrófico, além de que a produtividade máxima em biomassa também é bastante mais significativa em fermentador, 2,17 g/l.d, do que em *erlenmayer*, 0,86 g/l.d.

O gráfico (B) da figura 3.6. dá nos indicação do oxigénio dissolvido no meio, que vai diminuído com o aumento da densidade celular dentro do fermentador, e assim que esta atinge a fase estacionária o oxigénio aumenta até níveis de saturação uma vez que já não está a haver consumo porque também já não está haver crescimento celular.

No gráfico (C) da figura 3.6, está representada a concentração de glucose no meio, que inicialmente diminui devido ao crescimento exponencial da microalga ate às 100 horas, e a partir do momento em que adicionamos a fonte de alimentação o crescimento da micralga não é significativo, não havendo consumo de glucose, e esta vai-se acumulando, como se pode verificar no gráfico. Como a adição de glucose ao longo do tempo foi excessiva, excedendo os 50 g/l e até chegando a atingir 100 g/l, pode levar a uma inibição do crescimento por excesso de substrato. Segundo Xian-Ming Shi [24] níveis de glucose a ordem dos 80 g/l inibem a taxa de crescimento desta alga.

A partir das 200 horas o crescimento atinge a fase estacionária, havendo ainda disponível no meio oxigénio e glucose, para além dos outros nutrientes do meio de cultura, e portanto existe um outro factor limitante do crescimento não identificado.

No caso do controlo, isto não acontece uma vez que não há adição de substrato no meio, e como se pode observar pelo gráfico (B) da Figura 3.7., a glucose vai diminuindo com o aumento da densidade celular, atingindo a fase estacionária com glucose ainda no meio, o que nos indica que houve falta de outro nutriente no meio, e o que é reforçado com o facto do meio de cultura ser simples.

Analisando agora as células mortas dos dois reactores observamos que no fermentador estas se vão mantendo mais ou menos constantes num valor não significativo, ou seja muito baixo, em media 2%, gráfico (D) Figura 3.6., enquanto no controlo em *erlenmayer* a percentagem de células mortas é maior, aumentando gradualmente com o tempo, mas num valor também muito baixo e não significativo de cerca de 3 a 4%, gráfico (C) Figura 3.7, mas que nos indica mais uma vantagem do cultivo em fermentador.

Quanto aos lípidos produzidos, representados no gráfico (E) da Figura 3.6. para o fermentador, e no gráfico (D) da Figura 3.7. para o controlo em *erlenmayer*, determinados por citometria onde a fluorescência foi convertida em lípidos através de uma correlação feita anteriormente, de resultados não publicados obtidos no laboratório LNEG (ANEXO 5), ambos têm o mesmo perfil crescente ao longo do tempo e com o aumento da biomassa, mas no fermentador é alcançado 26,5% de lípidos enquanto no controlo em *erlenmayer* são atingidos apenas 17,4%, sendo que também a produtividade máxima em lípidos (ANEXO 6) é mais elevada no fermentador, 0,091 g/l.d, do que no controlo em *erlenmayer* 0,081 g/l.d, o que nos oferece mais uma vantagem no cultivo em fermentador, nomeadamente para a produção de biodiesel, uma vez que se consegue alcançar um teor de lípidos mais elevado.

Os gráfico (F) e (G) da Figura 3.6 dizem respeito à variação de gases, O₂ e CO₂. A variação de O₂ foi realizado de modo esperado, onde conseguimos ver pelo gráfico (F) que quando temos produção de biomassa dentro do fermentador há uma diminuição do O₂, e quando as células entram em fase estacionário o consumo diminui.

A variação de CO₂ é bastante importante neste ensaio, pois queremos produzir CO₂, para injectar na corrente gasosa do FBR de modo a que este tenha mais fonte de carbono proporcionando um maior crescimento da microalga.

Sendo assim, observando o gráfico (G) verificamos que há na realidade um aumento de CO₂ significativo, mais acentuada no inicio do ensaio, que é quando temos mais produtividade em biomassa, que depois decresce quando a biomassa atinge o estado estacionário, sendo que

tem uma média de produção de CO₂ de 0,08%, o que representa um aumento de 100% acima do valor da composição em CO₂ do ar comprimido que é de apenas, em média, 0,04%.

Sendo que houve uma produção de CO₂, por parte do fermentador, o ar que foi introduzido no FBR estava na realidade mais rico em CO₂, assim o crescimento autotrófico de *Chlorella protothecoides* que se encontrava nesse FBR, está representado na figura seguinte, Figura 3.8.,

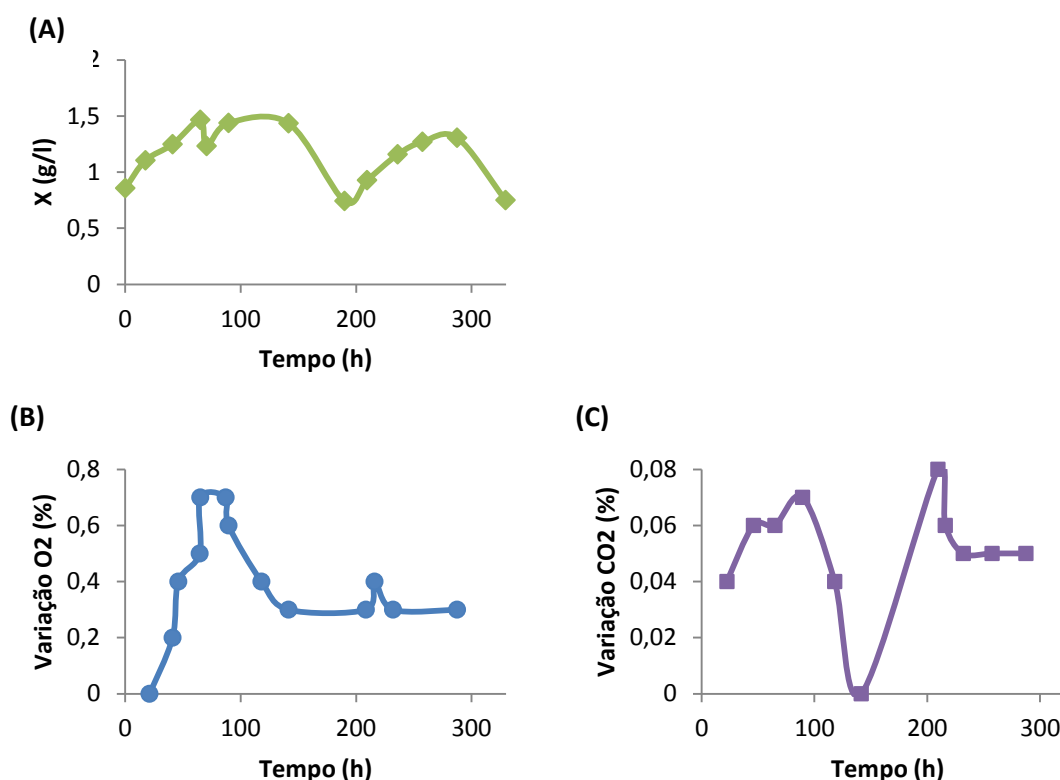


Figura 3.8.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições autotróficas, em operação descontínua seguida de semi-contínua, a receber ar rico em CO₂ proveniente da fermentação de *Chlorella protothecoides* heterotrófica. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação da percentagem de O₂; (C) Variação da percentagem de CO₂.

O ensaio teve o mesmo tempo de duração que o do fermentador, aproximadamente 16 dias, onde, tal como no fermentador, foi realizado um controlo, noutro FBR igual e a operar nas mesmas condições, com a diferença que a corrente gasosa de entrada era unicamente ar comprimido, de modo a podermos comparar os resultados dos dois FBR. Na figura seguinte, Figura 3.9, estão representados os parâmetros monitorizados ao longo do crescimento autotrófico, no FBR controlo,

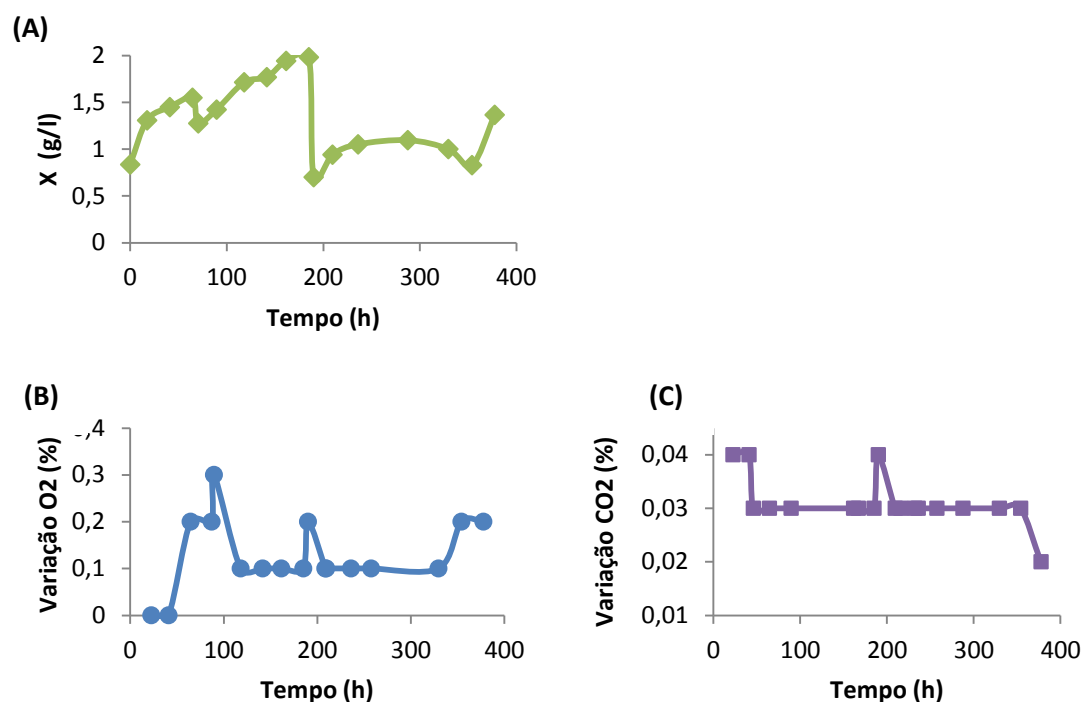


Figura 3.9.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições autotróficas, em operação descontínua seguida de semi-contínua, sendo o controlo do FBR em simbiose anterior. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação de percentagem de O₂; (C) Variação da percentagem de CO₂.

Tal como no caso do crescimento heterotrófico, para ser mais fácil a comparação dos dois Fotobioreactores, o simbiótico e o controlo, está representado na tabela seguinte os parâmetros chave:

Tabela 3.3.: Parâmetros de crescimento de *Chlorella protothecoides*, em meio inorgânico, em dois FBR, um FBR simbiótico e um controlo.

	μ_1 (h ⁻¹)	μ_2 (h ⁻¹)	X_{max} (g/l)	P_{Xmax} (g/l.d)
FBR-simbiótico	0,0078	0,0096	1,465	0,340
FBR-controlo	0,0255	0,0151	1,983	0,647

Começando por comparar as curvas de crescimento dos gráficos (A) das Figuras 3.8. e 3.9., reparamos que em ambas, ao terceiro dia, se verifica uma pequena diluição da cultura que se deve à reposição do volume de cultura, com água destilada, que evaporou devido à temperatura do laboratório.

De seguida ao oitavo dia há uma grande diluição em ambas as culturas, uma vez que a cultura, que estava em simbiose com o fermentador floculou. Assim teve de se dividir a cultura do controlo e repor o restante volume com meio fresco MCV, de modo a que continuasse o ensaio, e os dois FBR fossem comparáveis. Deste modo a partir desse ponto os dois FBR

iniciaram um novo crescimento com uma nova taxa de crescimento partindo da mesma densidade celular.

Sendo assim temos duas taxas de crescimento distintas, a primeira no FBR em simbiose foi de $0,0078 \text{ h}^{-1}$, enquanto no controlo foi de $0,026 \text{ h}^{-1}$, a segunda taxa de crescimento no FBR em simbiose foi de $0,0096 \text{ h}^{-1}$ e no controlo de $0,015 \text{ h}^{-1}$. Estas taxas de crescimento não estão em coerência, uma vez que no FBR em simbiose a taxa de crescimento devia ter sido mais elevada que no controlo porque estava a receber ar rico em CO_2 tendo mais fonte de carbono disponível. A biomassa máxima atingida e a produtividade em biomassa são ambas mais elevadas no controlo, $1,98 \text{ g/l}$ e $0,65 \text{ g/l.d}$, respectivamente, que no FBR em simbiose, $1,47 \text{ g/l}$ e $0,34 \text{ g/l.d}$.

Uma justificação provável para tal ter acontecido, foi o facto de em ensaios posteriores se ter descoberto que o eléctrodo de oxigénio poderia estar a verter electrólito para o meio, um electrólito tóxico para uma alga sensível como a *Chlorella prothecoides*, e por esse facto a alga ter floculado. Outro facto que corrobora com esta afirmação, é que na segunda parte do ensaio, o FBR que tinha o eléctrodo era o controlo, o que fez com que a taxa de crescimento fosse mais baixa, de $0,0255 \text{ h}^{-1}$ passou para $0,0151 \text{ h}^{-1}$, mas mesmo assim foi mais elevada que no FBR em simbiose porque este pode não ter sido bem lavado e continuar contaminado com o electrólito tóxico.

Apesar do crescimento no FBR em simbiose não ter sido o melhor, a variação de gases à saída do bioreactor, nos gráficos (B) e (C) da Figura 3.8., revelam ser muito maiores em relação ao controlo, gráficos (B) e (C) da Figura 3.9.. Embora apresentem ambos o mesmo perfil em relação à biomassa, maior diminuição de CO_2 e maior aumento de O_2 quando as células se encontram em fase exponencial, e estabilização desses valores na fase estacionária, em média o FBR simbiótico consumiu $0,05 \%$ de CO_2 face aos apenas $0,03\%$ no FBR controlo, o mesmo se verifica na produção de O_2 onde o FBR simbiótico produziu em média $0,4\%$ de O_2 enquanto o FBR controlo produziu apenas $0,13\%$. Estes valores mais baixos no FBR controlo podem dever-se ainda a uma inibição pelo aumento do pH no meio de cultura, o que não ocorreu no FBR em simbiose uma vez que este, tendo uma maior percentagem de CO_2 no meio, não deixa que pH aumente.

Apesar deste consumo e produção de gases, o crescimento autotrófico não foi melhorado provavelmente devido à contaminação com o eletrólito tóxico do eléctrodo de oxigénio. Num trabalho futuro poderia ser realizado mais uma vez este ensaio, nas mesmas condições, mas certificando que o eléctrodo está em boas condições.

3.3. Estudo da simbiose por troca gasosa entre *Clorella protothecoides* autotrófica e *Rhodotorula glutinis* heterotrófica

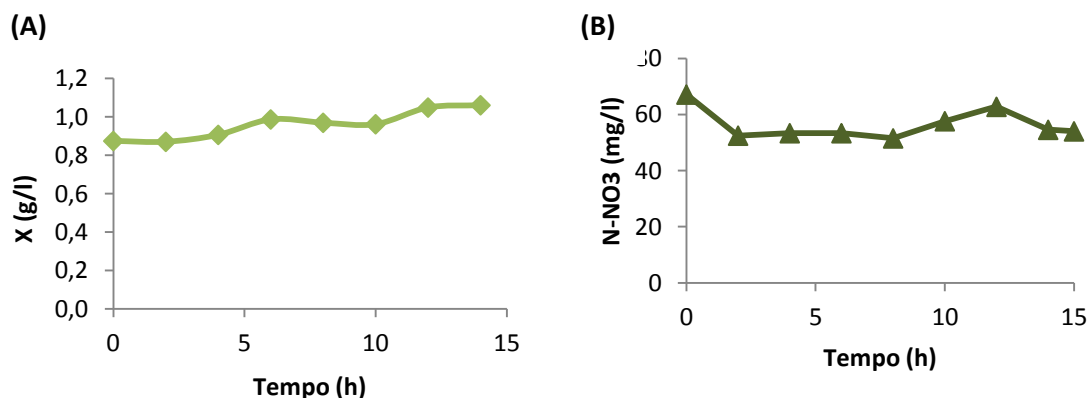
Uma vez que a simbiose entre *Clorella protothecoides* auto e heterotrófica não foi bem sucedida devido a falhas técnicas, optou-se por intensificar a produção de CO₂ usando uma levedura. Estudou-se então a simbiose de troca gasosa entre a mesma espécie de alga autotrófica e uma levedura, a *Rhodotorula glutinis*, também ela uma “single cell oil”, cultivada heterotroficamente, com grande potencial para produção de CO₂.

Foram realizados dois ensaios, tal como no estudo anterior, o primeiro onde a corrente gasosa de saída do FBR é a corrente de entrada no fermentador, de modo a alimentar a levedura com ar rico em oxigénio, e o segundo onde a corrente gasosa de saída do fermentador é a corrente de entrada no FBR, de modo a alimentar a alga autotrófica com ar rico em CO₂.

3.3.1. FBR -> Fermentador

O primeiro ensaio ocorre no sentido de fornecimento de ar rico em O₂, proveniente do FBR, para o fermentador alimentando a levedura, que foi realizado no FBR de 2,7 l como descrito na secção de materiais e métodos, onde não houve controlo devido ao problema com o eléctrodo de oxigénio, já explicado anteriormente, sendo assim podemos assumir como controlo, o FBR controlo usado no ensaio anterior.

A figura seguinte, Figura 3.10., representa a evolução dos parâmetros medidos ao longo do desenvolvimento de *Clorella protothecoides* autotrófica, em meio inorgânico:



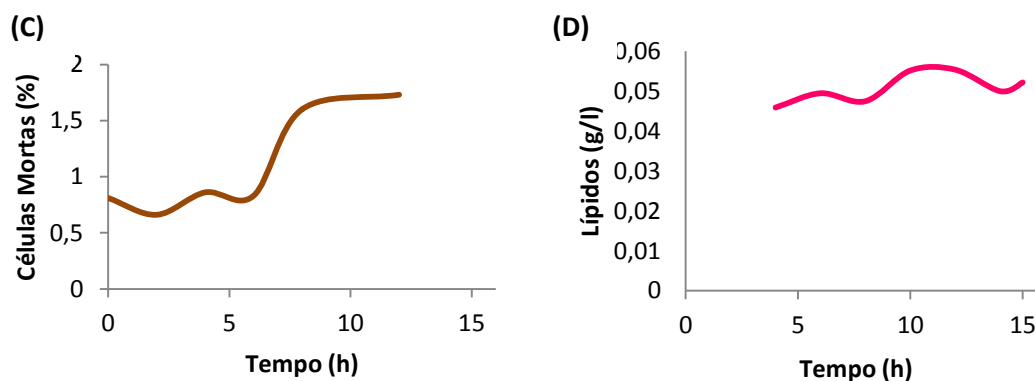


Figura 3.10.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições autotróficas. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Concentração de Nitrato N-NO_3^- , g/l; (C) Percentagem de células mortas; (D) Concentração de lípidos, g/l.

Uma vez que a levedura tem um tempo de duplicação muito maior que o da alga, apresentando taxas de crescimento mais elevadas [11], o ensaio teve apenas a duração de 15 horas, que é o tempo necessário para a levedura atingir a sua fase de maturação, fase estacionária, nas condições descritas nos materiais e métodos para o cultivo desta levedura.

Como se pode observar no gráfico (A) da Figura 3.10., o crescimento foi bem sucedido, atingindo um máximo de biomassa de 1,1 g/l com uma taxa de crescimento de $0,015 \text{ h}^{-1}$ e uma produtividade máxima em biomassa de 0,32 g/l.d, o que mostra estar em coerência com o controlo do estudo anterior, apesar da produtividade em biomassa ser ligeiramente mais baixa.

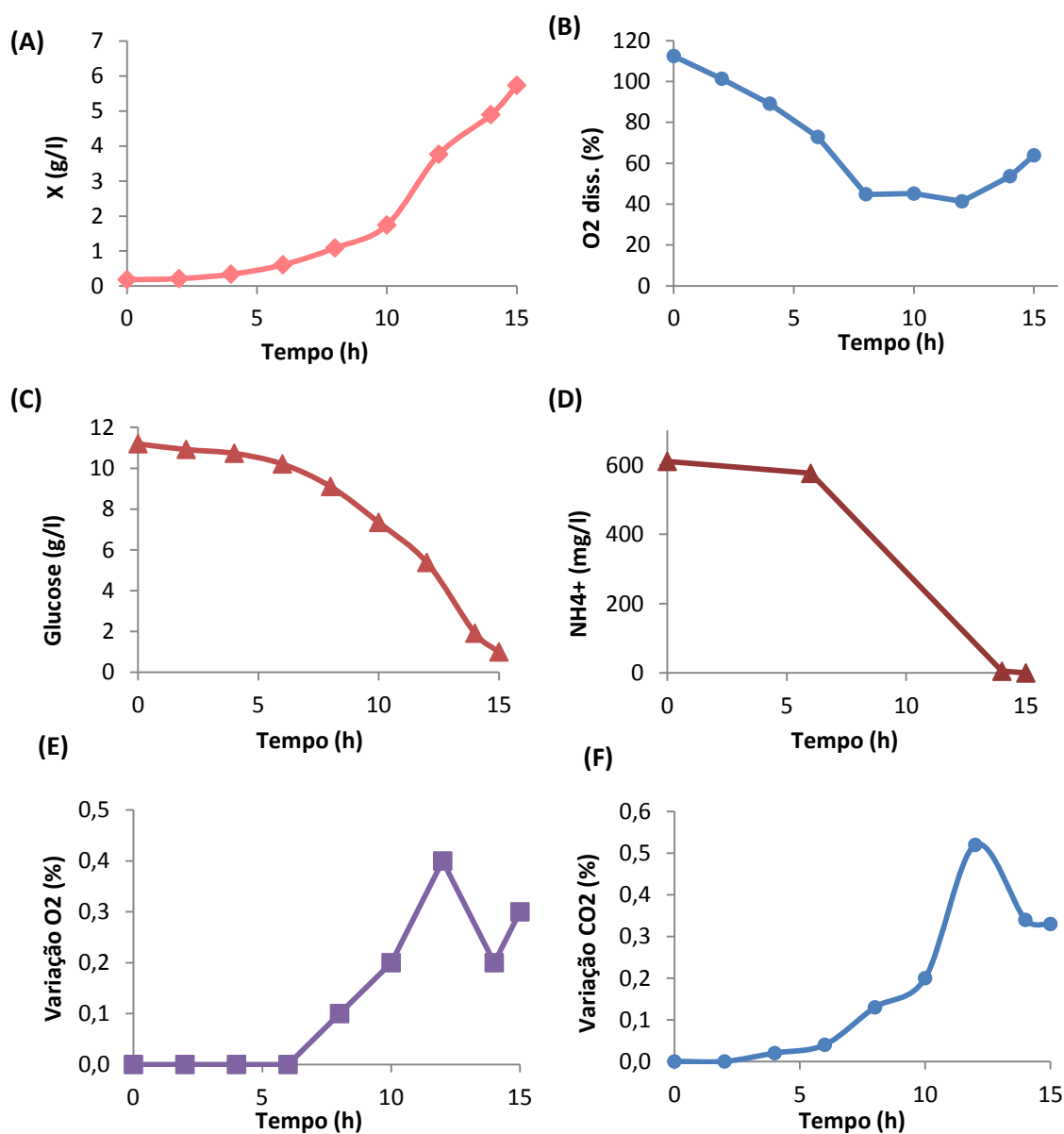
Observamos ainda que por volta das 10 horas há um pequeno aumento da densidade celular, devido a uma reposição do volume da cultura com meio fresco MCV, o que é corroborado com o gráfico (B) da mesma figura, que nos mostra a variação da concentração dos nitratos ao longo do crescimento. Este tem um perfil de decréscimo devido ao consumo por parte das microalgas com o decorrer do tempo, e que precisamente por volta das 10 horas tem um ligeiro aumento devido a essa reposição de volume com meio MCV, em vez de água destilada, que por ser uma reposição de um volume muito pequeno não houve diluição da cultura e por isso se observa um aumento da densidade celular. Neste ensaio a taxa volumétrica de consumo de nitratos (r_{NO_3}) (ANEXO 7) foi de 0,875mg/l.h, e o rendimento da biomassa em relação à fonte de N ($Y_{\text{X/N}}$) (ANEXO 8) foi de 0,0142 g biomassa/gN.

O gráfico (C) da Figura 3.10. mostra a percentagem de células mortas ao longo do ensaio, e como se pode observar a percentagem é sempre bastante baixa não ultrapassando nunca os 2%, embora tenha valores mais elevados no final do ensaio, o que nos indica que, uma vez que este FBR tinha o eléctrodo de oxigénio, as células podiam estar a começar a flocular, mas como o tempo do ensaio é curto tal não aconteceu.

Quanto à composição em lípidos, determinados por citometria, estes apresentam um perfil relativamente constante ao longo do tempo atingindo 0,055 g/l quando a biomassa é máxima, com uma produtividade máxima em lípidos de 0,1 g/l.h.

Neste ensaio optou-se por não medir a composição da corrente gasosa entre a simbiose, isto é, na saída do FBR, para não causar nenhum tipo de stress na cultura que recebe a corrente, neste caso é o fermentador com levedura, mas admitindo que a produção de O₂ é idêntica à do estudo anterior.

O crescimento heterotrófico de *Rhodotorula glutinis*, no fermentador, que recebeu ar rico em oxigénio, vindo da corrente de saída do FBR, está representado na Figura 3.11. onde também está representada a evolução de vários parâmetros medidos ao longo de todo o ensaio,



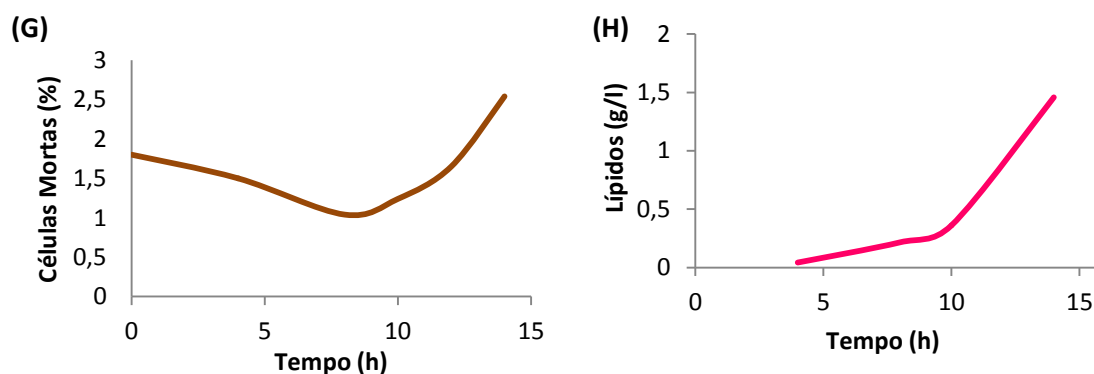


Figura 3.11.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Rhodotorula glutinis* em condições heterotróficas, a receber ar rico em O_2 proveniente do FBR. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação da percentagem de oxigénio dissolvido no meio; (C) Concentração de glucose, g/l; (D) Concentração de amónia, mg/l; (E) Variação da percentagem de O_2 ; (F) Variação da percentagem de CO_2 ; (G) Percentagem de células mortas; (H) Concentração de lípidos, g/l.

O ensaio teve a duração de 15 horas, como já foi referido, onde o controlador ligado ao fermentador monitorizou as rotações a 513 rpm, a temperatura a 30°C, o pH a 5,5, e ainda a concentração de oxigénio dissolvido no meio de cultura, e onde o caudal de ar de entrada foi a corrente de saída do FBR descrito anteriormente.

O crescimento foi bem sucedido, atingindo uma concentração em biomassa de 5,7 g/l, um valor bastante favorável ao comparar com resultados obtidos por Raoni Andrade [11], que conseguiu atingir apenas 4,5 g/l, mas com uma taxa de crescimento de $0,45 \text{ h}^{-1}$, muito mais elevada que a taxa de crescimento alcançada neste ensaio, $0,29 \text{ h}^{-1}$. Tal facto pode ser explicado por se ter usado uma agitação mais baixa, 513 rpm em vez de 700 rpm, o que faz com que a transferência de massa seja mais limitada, demorando mais tempo o crescimento, e resultando também numa fase de latência mais alargada como se pode verificar no gráfico (A) da Figura 3.11.. Estes resultados não eram esperados uma vez que a levedura estava a receber ar rico em oxigénio vindo do FBR.

O gráfico (B) da Figura 3.11. dá-nos informação do oxigénio dissolvido no meio, que decresce enquanto há aumento da densidade celular, começando a subir quando esta chega à fase estacionária.

O objectivo era fazer uma fermentação limitada pelo carbono, mas como podemos observar pelos gráficos (C) e (D) da Figura 3.11., que dizem respeito ao consumo de glucose e amónia pela levedura, respectivamente, constatamos que a glucose é praticamente esgotada ao fim de 15 horas, com uma taxa volumétrica de consumo de $0,68 \text{ g/l.h}$, tendo um rendimento em relação à biomassa de $0,544 \text{ g biomassa/g glucose}$, e a amónia é totalmente esgotada ao fim das 15 horas com uma taxa volumétrica de consumo (ANEXO 9) de 43 mg/l.h ,

tendo um rendimento em relação à biomassa de 9,1 g biomassa/g N. Mais uma vez estes valores não eram esperados uma vez que o meio era destinado a limitação de carbono tal como é referido por Yoon e Rhee [20], e não por limitação de fonte de azoto, que foi o que se sucedeu.

A variação de gases na saída do fermentador, é verificada nos gráficos (E) e (F) da mesma figura. Como seria de esperar o consumo de oxigénio e a produção de CO₂ vão crescendo à medida que a biomassa também vai aumentando, atingindo 0,4% de diminuição de O₂ e 0,5% de aumento de CO₂, o que se torna num valor bastante promissor para futuros projectos.

Quanto ao número de células mortas, este é bastante baixo, na ordem dos 2%, sendo que no final do ensaio atinge um valor máximo de 3%, continuando a ser um valor bastante baixo, mostrando que as células estavam em boas condições.

Sendo a *Rhodotorula glutinis* também uma “single cell oil”, verificou-se também o teor em lípidos, determinados por citometria onde a fluorescência foi convertida em lípidos através da correlação apresentada por Raoni Andrade [20], que crescem à medida que a biomassa também cresce, atingindo um valor máximo, no final do ensaio, de 1,46 g/l de lípidos, cerca de 30% de lípidos, com uma produtividade máxima em lípidos de 0,1g/l.h, o que nos demonstra que esta levedura é bastante promissora na produção de lípidos.

Por fim, e tendo por base os resultados obtidos por Raoni Andrade [20], verificamos que a simbiose de troca gasosa no sentido de fornecimento de ar rico em O₂ ao fermentador com levedura proveniente do FBR, não foi favorável uma vez que o FBR não produziu oxigénio suficiente para aumentar a taxa de crescimento da levedura, tendo sempre em conta que a produção de O₂ por parte do FBR estava afectada pelo eléctrodo de oxigénio que poderia estar a libertar electrólito para o meio de cultura.

3.3.2. Fermentador -> FBR

Uma vez que a levedura *Rhodotorula glutinis* se mostrou uma produtora de CO₂, o segundo ensaio com simbiose de troca gasosa entre *Chlorella protothecoides* autotrófica e a levedura *Rhodotorula glutinis*, é realizado no sentido de fornecimento de ar rico em CO₂ proveniente do fermentador, ao FBR.

A Figura 3.12., representa a evolução dos parâmetros medidos ao longo do desenvolvimento de *Rhodotorula*, em meio orgânico com limitação de carbono:

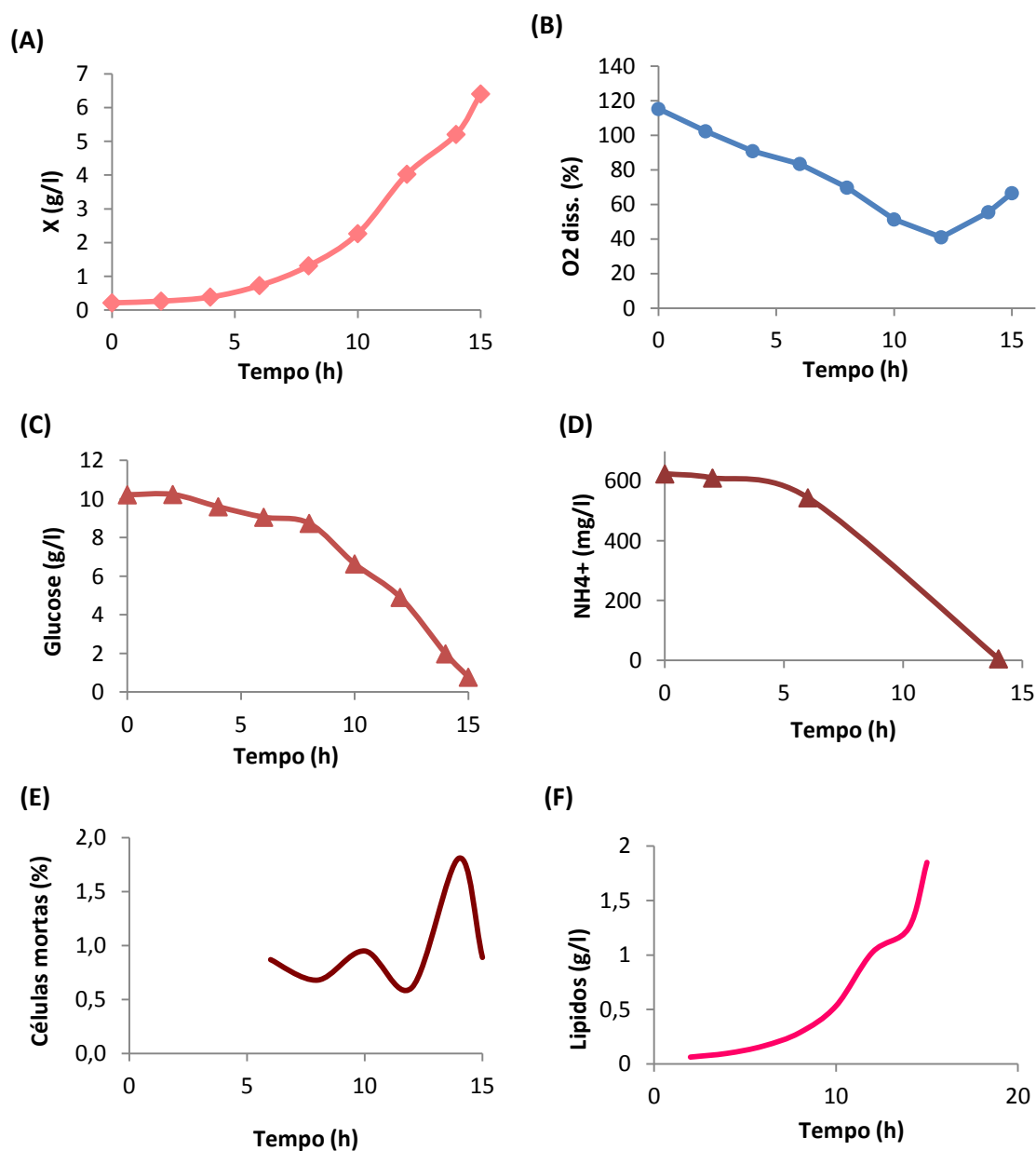


Figura 3.12.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Rhodotorula glutinis* em condições heterotróficas. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Variação da percentagem de oxigénio dissolvido no meio; (C) Concentração de glucose, g/l; (D) Concentração de amónia, mg/l; (E) Percentagem de células mortas; (F) Concentração de lípidos, g/l.

O ensaio, tal como o anterior teve a duração de 15 horas, e como se pode verificar no gráfico (A) da Figura 3.12., teve uma fase de latência de cerca de 4 horas, seguindo-se uma fase exponencial com uma taxa de crescimento de $0,29 \text{ h}^{-1}$. Tanto a fase de latência como a taxa de crescimento foram mais favoráveis neste ensaio do que no anterior, dando-nos indicação de que a levedura se encontra em óptimo estado de produção de biomassa, que atingiu o seu valor máximo de $6,41 \text{ g/l}$, e uma produtividade máxima em biomassa de $0,41 \text{ g/l.h}$, que se reflecte posteriormente numa melhor produção de CO_2 , que alimentará de forma mais eficaz o FBR.

Pelo gráfico (B) da mesma figura verificamos que a cultura chegou à sua fase estacionária, uma vez que o oxigénio que estava a ser consumido, em decréscimo constante com o aumento da biomassa, começa a aumentar dentro do reactor, dizendo que o consumo está a abrandar, ou seja, que a fase estacionária está a ser atingida.

Mais uma vez, como no ensaio anterior, o meio utilizado era, supostamente, de limitação de carbono, o que não se sucede, uma vez que ao fim de 15 horas ainda há vestígios de glucose, gráfico (C) Figura 3.12., enquanto a amónia já foi totalmente esgotada com um taxa volumétrica de consumo de 44 mg/l.h e com um rendimento em relação à biomassa de $10 \text{ g biomassa/g N}$. A taxa volumétrica de consumo de glucose foi de $0,63 \text{ g/l.h}$ e o rendimento em relação à biomassa foi de $0,66 \text{ g biomassa/g glucose}$. Ambas as taxas volumétricas de consumo e os rendimentos em relação à biomassa estão em coerência com as apresentadas no ensaio anterior e com os resultados obtidos por Raoni Andrade [20]

Foi também monitorizado por citometria, as células mortas, gráfico (E) Figura 3.12., que se revelam sempre muito baixas, tendo um pico máximo às 14 horas de cerca de 2%, o que não é significativo.

Quanto aos lípidos, estes vão acompanhando o crescimento de biomassa, gráfico (F) Figura 3.12, atingindo o seu máximo de $1,85 \text{ g/l}$, quando a biomassa é máxima também, e tendo uma produtividade máxima em lípidos de $0,120 \text{ g/l.h}$.

Com estes resultados verifica-se que o crescimento da levedura deste ensaio, assim como a sua produtividade em lípidos, foi melhor que no ensaio anterior, proporcionando um arejamento mais rico em CO_2 para a cultura autrófica de *Chlorella protothecoides*.

Neste ensaio não foi medida a composição da corrente gasosa de saída do fermentador, em CO_2 e O_2 , para que não houvesse perturbações no arejamento do FBR.

Admitindo que a produção de CO_2 por parte do fermentador com levedura foi semelhante ao ensaio anterior, o ar que foi injectado como corrente gasosa de entrada no FBR, ia rico em CO_2 , assim o crescimento autotrófico de *Chlorella protothecoides* que se encontrava nesse FBR, está representado na figura seguinte, Figura 3.13.,

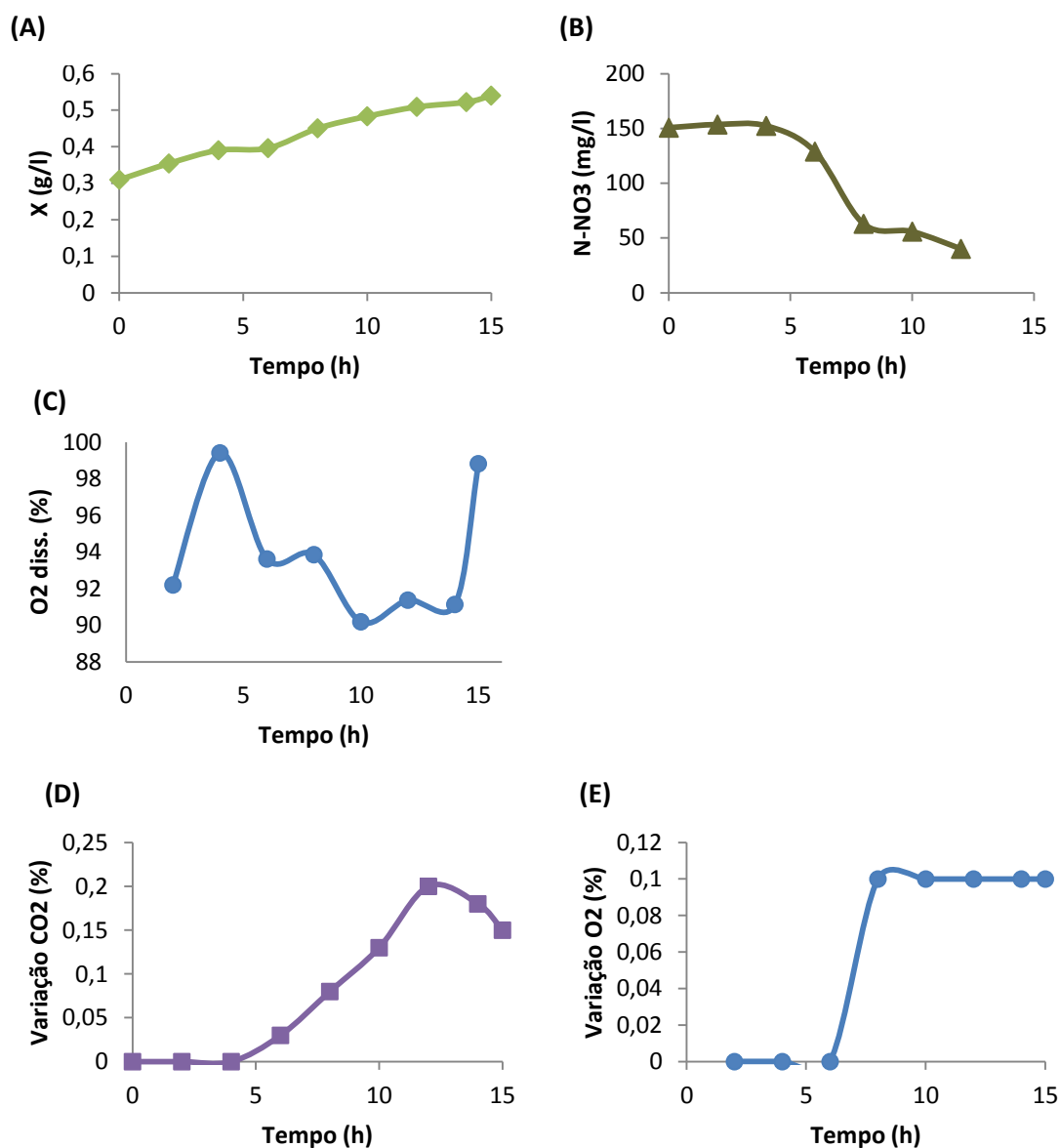


Figura 3.13.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições autotróficas, a receber ar rico do fermentador com *Rhodotorula glutinis*. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Concentração de Nitrato N-NO_3^- , g/l; (C) Variação da concentração de oxigénio dissolvido no meio, mg/l; (D) Variação da percentagem de CO_2 ; (E) Variação da percentagem de O_2 .

O ensaio teve o mesmo tempo de duração que o do fermentador, 15 horas, onde foi realizado um controlo, noutro FBR igual e a operar nas mesmas condições, com a diferença que a corrente gasosa de entrada era unicamente ar comprimido, de modo a podemos

comparar os resultados dos dois FBR. Tal já tinha sido feito no estudo da simbiose de troca gasosa entre os dois trofismos de *Chlorella protothecoides*, mas devido a várias variações, quer em termos de cultura quer em termos da composição do ar comprimido, voltou-se a fazer um controlo para que a comparação entre os dois crescimentos fosse mais precisa. Na figura seguinte, Figura 3.14., estão representados os parâmetros monitorizados ao longo do crescimento autotrófico, no FBR controlo,

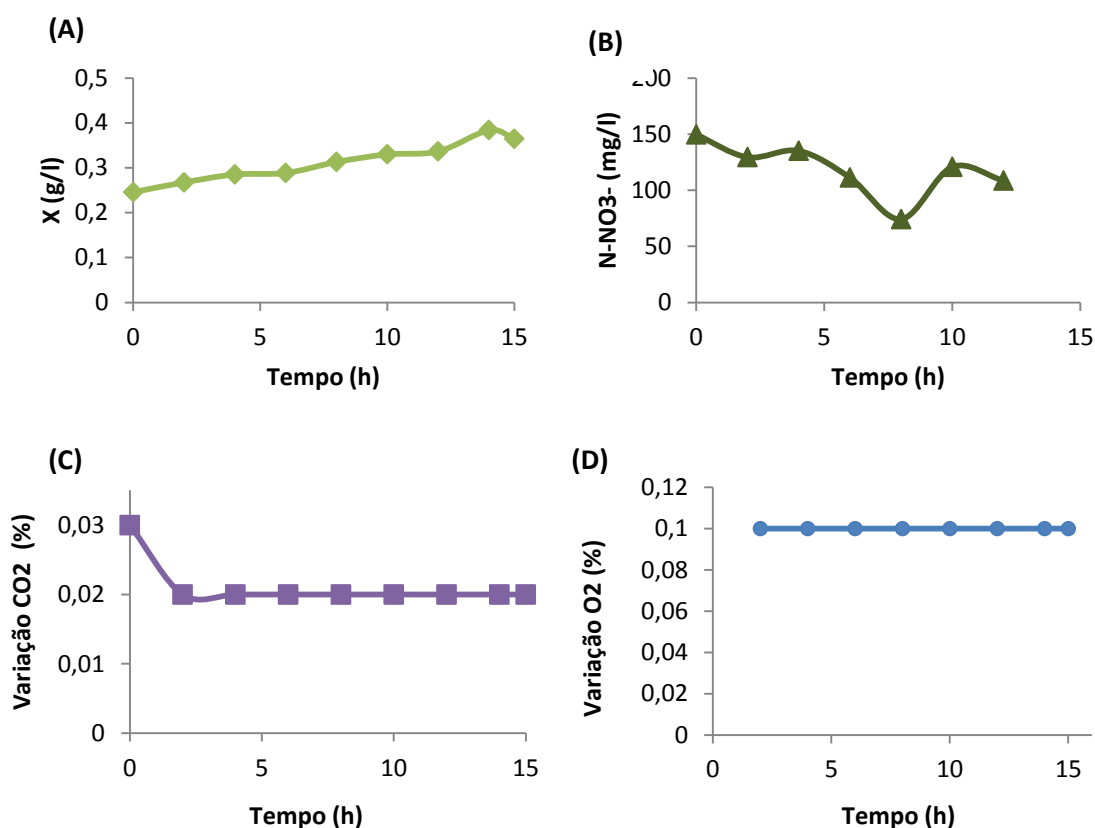


Figura 3.14.: Evolução dos parâmetros medidos na cultura de *Chlorella protothecoides* em condições autotróficas, como controlo do FBR anterior. Ao longo do tempo (h) de cultura estão representados: (A) Concentração da biomassa, g/l; (B) Concentração de Nitrato N-NO₃⁻, g/l; (C) Variação da percentagem de CO₂; (D) Variação da percentagem de O₂.

De modo a ser mais fácil comparação dos dois Fotobioreactores, o simbiótico e o controlo, está representado na tabela seguinte os parâmetros chave:

Tabela 5.4.: Parametros de crescimento de *Chlorella protothecoides*, em meio inorganico, em dois FBR, um FBR simbiótico e um controlo

	μ_1 (h ⁻¹)	X_{max} (g/l)	$P_{X_{max}}$ (g/l.d)	$Y_{X/N}$ (g/g)
FBR-simbiótico	0,037	0,52	0,022	2,10
FBR-controlo	0,029	0,38	0,011	2,88

Começando por comparar as curvas de crescimento dos gráficos (A) das Figuras 3.13. e 3.14., verificamos que ambas têm um crescimento contínuo ao longo das 15 horas de ensaio, embora no FBR controlo se verifique um pequeno aumento de densidade celular, às 12 horas, devido à reposição do volume de cultura com meio MCV fresco, como se pode verificar também no gráfico (B) da Figura 3.14, onde a concentração de nitratos aumenta ligeiramente no mesmo tempo. É também pelo mesmo motivo que o rendimento de biomassa em relação á fonte de azoto é maior no FBR controlo, 2,88 g biomassa/g N, do que no FBR simbiótico, 2,10 g biomassa/g N, uma vez que há mais nitrato disponível.

A taxa de crescimento do FBR em simbiose foi de $0,037 \text{ h}^{-1}$, enquanto no FBR controlo foi de apenas $0,029 \text{ h}^{-1}$, o que mostra um efeito bastante positivo na simbiose realizada, onde o FBR que recebe ar rico em CO_2 vindo do fermentador com levedura, tem uma taxa de crescimento superior, chegando a atingir 0,52 g/l de biomassa, enquanto o controlo atingiu apenas 0,38 g/l, tendo em conta que ambos começaram o ensaio com a mesma densidade celular. Também em termos de produtividade máxima de biomassa o FBR em simbiose teve melhores resultados, $0,022 \text{ g/l.h}$ do que o FBR controlo, com apenas $0,011 \text{ g/l.h}$, o que significa um melhoramento da produtividade na ordem dos 100%.

É de realçar ainda que o FBR em simbiose tinha o eléctrodo de oxigénio, que possivelmente estaria a contaminar a cultura com electrólito, o que faz com que os resultados apresentados pudessem ter sido melhores, apesar de mesmo assim se ter confirmado uma simbiose positiva entre a levedura *Rhodotorula glutinis* e a alga *Chlorella protothecoides* no sentido de enriquecimento do ar com CO_2 através da fermentação da levedura, ao FBR.

4. Conclusão

Já a partir destes ensaios, podemos concluir que o meio MCS, um meio de cultura simples, para o cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides*, é o meio que atinge os melhores resultados tanto em velocidade de crescimento como em quantidade de biomassa, isto em comparação com um meio Standard completo, e os outros meios com fontes de carbono alternativas ao seu cultivo, testadas também neste trabalho, o Acetato, Glicerol, Lactose e Xilose.

Nos ensaios de simbiose entre fermentação e FBR apenas permitindo a troca gasosa, com *Chlorella protothecoides* hetero e autotrófica, respectivamente, de modo a verificar se havia algum efeito simbiótico positivo no crescimento do reactor que recebia ar enriquecido pelo outro reactor. No ensaio onde a corrente gasosa de saída do FBR era a corrente de entrada no fermentador, verificou-se que não havia nenhum efeito positivo no crescimento de *Chlorella protothecoides* heterotrófica apesar de haver produção de O₂ por parte do FBR, mas uma vez que neste ensaio o FBR usado tinha apenas 600ml de capacidade de cultura, era de esperar que não conseguisse produzir O₂ suficiente para aumentar o crescimento da cultura heterotrófica que era bastante mais densa que a cultura autotrófica. Para trabalho futuro deveria repetir-se este ensaio, mas com o FBR de 2,7 l para verificar, se com uma maior volume de cultura autotrófica, face ao reactor heterotrófico, a simbiose de troca gasosa já é positiva.

No sentido inverso, onde a corrente de saída do fermentador era a corrente de entrada no FBR, também não se conseguiu provar um efeito positivo da simbiose, uma vez que houve um problema de contaminação com electrólito, por parte do eléctrodo de oxigénio, fazendo com que a cultura autotrófica de *Chlorella protothecoides* fosse inibida e floculasse ao fim de poucas horas de ensaio.

Uma vez que a simbiose entre os dois trofismos de *Chlorella protothecoides* não foi bem sucedida devido a falhas técnicas, optou-se por experimentar a simbiose entre a mesma espécie de *Chlorella* autotrófica e a levedura *Rhodotorula glutinis*, sendo esta última também uma “single cell oil” e boa produtora de CO₂.

No ensaio onde a corrente gasosa de saída do FBR era a corrente gasosa de entrada no fermentador com levedura, os resultados não foram positivos, em relação à simbiose, uma vez que, mais uma vez o eléctrodo de oxigénio estava, possivelmente, a contaminar a cultura com electrólito, debilitando a alga fazendo com esta não tivesse um crescimento normal e consequentemente limitando a produção de O₂. Já no ensaio inverso, onde a corrente de saída do fermentador com levedura era a corrente de entrada no FBR, tivemos um efeito positivo no

crescimento de *Chlorella protothecoides* autotrófico, mostrando um aumento tanto na taxa de crescimento, de 30%, como na produtividade em biomassa de 100%.

Como pudemos comprovar, a simbiose aplicada aos bioreactores associados com dois metabolismos de nutrição complementares quer entre a mesma espécie de microalga quer entre uma microalga e uma levedura oleaginosas pode ser um caminho viável para contribuir com enormes vantagens no aumento de produção de lípidos microbianos para biodiesel.

Como perspectiva futura, seria notável a realização de um ensaio onde os dois bioreactores, fermentador e FBR, fossem ligados entre si num circuito fechado, onde o FBR forneceria O_2 ao fermentador e em simultâneo este forneceria CO_2 ao FBR, de modo a se conseguir tirar o máximo de partido da composição de ambos os bioreactores, potenciando uma melhor taxa de crescimento e uma melhor produtividade em lípidos.

Bibliografia

- [1] Mata T.M., Martins A.A.,Caetano N.S., *Microalgae for biodiesel prodution and other application: A review*, Renew Sustain Energy Rev, **2009**, 14, 217-232.
- [2] Wen Z., Johnson M. B., *Microalgae as a feedstock for biofuel production*, Virginia Cooperative Extension, **2009**, Publication 442-886.
- [3] Gomez J.L., Ladislao B.A., *Second-generation biofuels and local bioenergy systems*, Biofpr, **2008**, 2:455-469.
- [4] Chisti Y., *Biodiesel from microalgae*, Biotechnology Advances, **2007**, 25: 294-306.
- [5] Santos C.A., Ferreira M.E., Silva T.L., Reis A., *A symbiotic gás Exchange between bioreactors enhances microalgal biomass ans lipid productivities: taking advantage of complementary nutritional modes*, J.Ind Microbiol Biotechnol, **2010**, 38(8):909-17.
- [6] Grobberlaar J.U., *Algal Nutrition: Mineral Nutrition*, em: Richmond Amos (ed) Handbook of microalgal Culture: Biotechnology and applied phycology, Blackwell, London, **2004**, pp 97 - 114.
- [7] Lee Y.K., *Algal Nutrition: Heterotrophic Carbon Nutrition*, em: Richmond Amos (ed) Handbook of microalgal Culture: Biotechnology and applied phycology, Blackwell, London, **2004**, pp 116 - 121.
- [8] Garcia O.P., Escalante F.M.E, et al, *Heterotrophic culture of microalgae: metabolism and potencial products*, Water Research, **2011**, 45: 11-36.
- [9] Iwamoto H., *Industrial Prodution of Microalgal Cell-mass and Secondary Products – Major Industrial Species: Chlorella*, em: Richmond Amos (ed) Handbook of microalgal Culture: Biotechnology and applied phycology, Blackwell, London, **2004**, pp 255 - 262.

- [10] Lee J.S., Kim D.K., et al, *Effects of SO₂ and NO on growth of Chlorella sp KR-1*, Bioresource Technol, **2002**, 82: 1-4.
- [11] Andrade R., Dissertação em Biotecnologia, *Estudo do desenvolvimento da levedura Rhodotorula glutinis NCYC 1026 em culturas descontínuas, monitorizadas por citometria de fluxo, para obtenção de biodiesel e carotenóides*, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, **2010**.
- [12] Silva T.L., Reis A., Hewitt C., *Citometria de fluxo – Funcionalidade celular on-line em bioprocessos*, Boletim de Biotecnologia, **2004**, 77: 32-40.
- [13] Silva T.L., Santos C.A., Reis A., *Multi-parameter flow cytometry as a tool to monitor heterotrophic microalgal batch fermentations for oil production towards biodiesel*, Biotechnol Bioprocess Engineering, **2009**, 14: 330-337.
- [14] Bligh E.G., Dyer W.J., *A rapid method for total lipid extraction and purification*, Can J. Biochem Physiol, **1959**, 37: 911 – 917.
- [15] Miao X., Wu Q., *Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil*, Bioresource Technology, **2006**, 97: 841-846.
- [16] K. Kimura, M. Yamaoka, Y. Kamisaka, *Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence*, J Microbiological Methods, **2004**, 56: 331-338.
- [17] Jara A., Mendoza H., Martel A., Molina C., *Flow cytometric determination of lipid content in a marine dinoflagellate, Crypthecodinium cohnii*, J Applied Phycology, **2003**, 15: 433–438.
- [18] Vonshak A., *Laboratory techniques for the cultivation of microalgae*, em: Richman Amos (ed) Handbook of microalgal mass culture, Blackwell, London, **1986**, 117 – 145.

- [19] Wu Q.Y., Yin S., Sheng G.Y., Fu J.M., *New discoveries in study on hydrocarbons from thermal degradation of heterotrophically yellowing algae*, Science China, **1994**, 37: 326 – 335.
- [20] Yoon S.H., Rhee J.S., *Lipid from Yeast Fermentation: Effects of Cultural Conditions on Lipid Production and Its Characteristics of Rhodotorula glutinis*, J American Oil Chemists' Society, **1983**, 60: 1281-1286.
- [21] Miller G. L., *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*, Analytical Chemistry, **1959**, 31: 426-428.
- [22] APHA, *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, American public Health Association, **2000**; 4: 114 - 115.
- [23] Bailey J. E, Ollis D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2ªEdição, McGraw-Hill, New York, **1986**, página 463.
- [24] Shi X.M., Liu H.J., Zhang X.W., Chen F., *Production of biomass and lutein by Chlorella protothecoides at various glucose concentrations in heterotrophic cultures*, Process Biochemistry, **1999**, 34: 341-347

ANEXOS

Anexo 1: Cálculo das taxas de crescimento

As taxas específicas de crescimento (μ) de cada ensaio foram calculadas através do gráfico $\ln X$ em função do tempo, correspondendo ao declive da correlação linear dos pontos, relativos à fase de exponencial de crescimento.

Anexo 2: Cálculo da Produtividade volumétrica em Biomassa

Sabendo as concentrações de biomassa da amostra a ser analisada e a amostra inicial, pode calcular-se a produtividade volumétrica da biomassa pela equação:

$$P_x = \frac{X - X_i}{\Delta t}$$

Onde P_x é a produtividade volumétrica da biomassa ($\text{g.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$), X é a concentração de biomassa na amostra a ser analisada (g/l), X_i é a concentração da biomassa no início do ensaio, e Δt é o intervalo de tempo decorrido (d).

Anexo 3: Cálculo do Rendimento em relação à fonte de carbono

Sabendo-se as concentrações da fonte de carbono, que neste trabalho foi unicamente glucose, inicial e final, e a concentração de biomassa formada no mesmo período de tempo, o rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono foi calculada pela seguinte equação,

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f}$$

Onde $Y_{X/S}$ é o rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono ($\text{g}_{\text{Biomassa}}/\text{g}_{\text{subs.consumido}}$), X_f é a concentração de biomassa no final do ensaio (g), X_i é a concentração de biomassa no início do ensaio (g), S_i é a concentração de substrato, neste caso glucose, no início do ensaio (g), e S_f é a concentração de substrato no final do ensaio (g).

Anexo 4: Cálculo da taxa volumétrica de consumo de Glucose

A taxa volumétrica de consumo de glucose foi calculada através da seguinte equação:

$$r_{Glu} = \frac{[Glu]_i - [Glu]_f}{\Delta t}$$

Onde r_{Glu} é a taxa volumétrica de consumo de glucose ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$), $[Glu]_i$ é a concentração de glucose no início do ensaio(g), $[Glu]_f$ é a concentração de glucose no final do ensaio (g), e Δt é o intervalo de tempo decorrido no ensaio (h).

Anexo 5: Correlação entre a fluorescência e o teor em lípidos totais, para *Chlorella protothecoides*

A recta de correlação da fluorescência emitida pelo Vermelho do Nilo, detectada pelo citómetro de fluxo, e o teor de lípidos totais, extraídos pelo método de Bligh e Dyer [14], determinada em ensaios anteriores no mesmo laboratório, em resultados não publicados, tem um coeficiente de correlação de 0,973 e é representada pela equação, %Lip.totais = 0,132 x FLtotal + 3,77.

Anexo 6: Cálculo da Produtividade volumétrica em lípidos totais

Sabendo as concentrações de lípidos totais da amostra a ser analisada e a amostra inicial, pode calcular-se a produtividade volumétrica em lípidos totais pela equação:

$$P_{LT} = \frac{LT - LT_i}{\Delta t}$$

Onde P_x é a produtividade volumétrica em lípidos totais ($\text{g.l}^{-1}.\text{d}^{-1}$), LT é a concentração de lípidos totais na amostra a ser analisada (g/l), LT_i é a concentração da lípidos totais no início do ensaio, e Δt é o intervalo de tempo decorrido (d).

Anexo 7: Cálculo da taxa volumétrica de consumo de Nitrato

A taxa volumétrica de consumo de nitrato foi calculada através da seguinte equação:

$$r_{NO_3^-} = \frac{[NO_3^-]_i - [NO_3^-]_f}{\Delta t}$$

Onde $r_{NO_3^-}$ é a taxa volumétrica de consumo de nitrato ($g.l^{-1}.h^{-1}$), $[NO_3^-]_i$ é a concentração de nitrato no início do ensaio(mg), $[NO_3^-]_f$ é a concentração de nitrato no final do ensaio (mg), e Δt é o intervalo de tempo decorrido no ensaio (h).

Anexo 8: Cálculo do Rendimento em relação à fonte de azoto

Sabendo-se as concentrações da fonte de azoto inicial e final, e a concentração de biomassa formada no mesmo período de tempo, o rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto foi calculada pela seguinte equação,

$$Y_{X/N} = \frac{X_f - X_i}{N_i - N_f}$$

Onde $Y_{X/N}$ é o rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto ($\text{g}_{\text{Biomassa}}/\text{g}_{\text{N.consumido}}$), X_f é a concentração de biomassa no final do ensaio (g), X_i é a concentração de biomassa no início do ensaio (g), N_i é a concentração de azoto no início do ensaio (g), e N_f é a concentração de azoto no final do ensaio (g).

Anexo 9: Cálculo da taxa volumétrica de consumo de amónia

A taxa volumétrica de consumo de amónia foi calculada através da seguinte equação:

$$r_{NH_4^+} = \frac{[NH_4^+]_i - [NH_4^+]_f}{\Delta t}$$

Onde r_{NH_4} é a taxa volumétrica de consumo de amónia ($g.l^{-1}.h^{-1}$), $[NH_4^+]_i$ é a concentração de amónia no início do ensaio(mg), $[NO_3^-]_f$ é a concentração de nitrato no final do ensaio (mg), e Δt é o intervalo de tempo decorrido no ensaio (h).